

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. Norbert Roewer

**Die anti-apoptischen Effekte der Pim-1 Kinase im Rahmen der
ischämischen und Desfluran-induzierten Postkonditionierung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Teresa Magdalena Hilz

aus Offenburg

Würzburg, Oktober 2016

Referent: Professor Dr. med. Markus Lange

Koreferent: Professor Dr. Kai Schuh

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2017

Die Promovendin ist Ärztin.

Meiner Familie in Liebe gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Postkonditionierung	2
1.1.1	Ischämische Postkonditionierung	3
1.1.2	Anästhetika-induzierte Postkonditionierung	3
1.1.3	Signaltransduktion der Postkonditionierung	4
1.1.3.1	Die Pim-1 Kinase – eine Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase.....	7
1.1.4	Postkonditionierung in klinischen Studien	8
1.2	Fragestellung	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Durchführung der Untersuchung	11
2.1.1	Versuchsgenehmigung	11
2.1.2	Versuchstiere	11
2.1.3	Narkose und Beatmung	11
2.1.4	Präparation.....	12
2.1.5	Induktion der myokardialen Ischämie	13
2.1.6	Beendigung des Experiments	13
2.1.7	Auswertung des Experiments	14
2.2	Experimentelles Protokoll.....	14
2.3	Molekularbiologische Untersuchungen	17
2.3.1	Entnahme von Myokardgewebe	17
2.3.1.1	Protokoll zur Organentnahme	17
2.3.2	Herstellung der Proben	18
2.3.3	Konzentrationsbestimmung nach Bradford	19
2.3.4	Probenvorbereitung	19
2.3.5	Gelelektrophorese	19
2.3.6	Westernblot.....	21
2.3.7	Antikörper-Inkubation	22
2.3.8	Entwicklung.....	23
2.4	Auswertung	23
2.5	Statistik	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Hämodynamik.....	27

Inhaltsverzeichnis

3.2	Herzinfarktgröße	27
3.3	Proteinexpression im Westernblot	29
4	Diskussion	33
5	Zusammenfassung	42
6	Literaturverzeichnis	43

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

AAR	area at risk; ischämisches Myokardareal
AFAP-1	apoptotic protease activating factor-1
AKT	Proteinkinase B
ANOVA	analysis of variance; Varianzanalyse
APC	Anästhetika-induzierte Präkonditionierung
APOST	Anästhetika-induzierte Postkonditionierung
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-2 associated death promoter
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 Protein
BL	Baseline
CAMK	Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase
CAO	Koronararterienokklusion
CK	Creatin-Kinase
cm	Centimeter
CON	Kontrolle
Cyt C	Cytochrom C
DES	Desfluran
DMSO	Dimethylsulfoxid
EKG	Elektrokardiogram
g	Gramm

Abkürzungsverzeichnis

G-P-Rezeptor	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
HF	Herzfrequenz
IGF-1	Insulinlike Growth Faktor 1
Ig-G	Imunglobulin G
IPC	Ischämische Präkonditionierung
IPOST	Ischämische Postkonditionierung
IS	Infarktzone
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LIF	Leukemia inhibitory factor
LV	Linker Ventrikel
m	Meter
M	molar
mA	Milliampere
MAC	Minimale Alveoläre Konzentration
MAD	Mittlerer arterieller Druck
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm	Millimeter

Abkürzungsverzeichnis

mPTP	mitochondriale Permeabilitätspore
MRT	Magnetresonanztomographie
nm	Nanometer
NRCM	neonatal rat cardiac myocytes, Kardiomyozyten von neonatalen Ratten
PBS	Phosphate buffered saline
PI3-K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIM	Proviral Insertion site for Moloney Murine Leukemia Virus
PIM-Inh. II	Pim-1 Kinase Inhibitor II
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
PreCAO	vor der Koronararterienokklusion
RISK	Reperfusion-Injury-Salvage-Kinase
SDS	Sodium-dodecyl-Sulfat
SEM	standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwerts
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
TTC	2,3,5-Triphenylazolium-Chlorid
V	Volt
WHO	World Health Organization; Weltgesundheitsorganisation
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

1 Einleitung

Laut Bericht des statistischen Bundesamtes zählten im Jahre 2014 der akute Myokardinfarkt und die chronisch ischämische Herzkrankheit mit 5,5% bzw. 8,0% Anteil an den Sterbefällen zu den zwei häufigsten Todesursachen in der Bundesrepublik Deutschland^[1]. Eine Antwort darauf gibt der Report der WHO über die globalen Gesundheitsrisiken. Zu den häufigsten Gesundheitsrisiken gehören Bluthochdruck, Tabakkonsum, erhöhter Blutzucker, Bewegungsarmut, Übergewicht und erhöhtes Serumcholesterin^[2]. All diese Faktoren tragen als Risikofaktoren bei, einen Myokardinfarkt zu erleiden. Durch eine bessere und frühzeitig durchgeführte Reperfusionstechnik mittels Thrombolyse sowie Perkutaner Coronarer Intervention (PCI) gelang es in den letzten Jahren die Größe eines Myokardinfarktes zu vermindern. Die Reperfusion kann jedoch selbst zu einer Schädigung des zuvor ischämischen Bereichs am Myokard führen. Sowohl Braunwald et al.^[3] als auch Yellon et al.^[4] konnten zeigen, dass die Reperfusion selbst den Tod von Kardiomyozyten verursachen kann. Dies wurde als „tödlicher Reperfusionsschaden“ (lethal reperfusion injury) oder Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) bezeichnet. Nach Schätzungen entstehen circa 50% der Größe des Myokardinfarkts durch die Reperfusion^[4]. Der Schaden am myokardialen Gewebe führt zu einer kardialen Dysfunktion. Die Dysfunktion kann sich als Arrythmie^[5], myokardiales Stunning^[6], no-reflow Phänomen^[7] oder tödlicher Reperfusionsschaden darstellen. Hier setzt das Phänomen der Postkonditionierung an. Unter Postkonditionierung versteht man Interventionen während der frühen Reperusionsphase, die das Ausmaß des Ischämie-/Reperfusionsschadens reduzieren können. Um Postkonditionierung zielgerichtet einsetzen zu können und um neue Therapieoptionen zu entwickeln, müssen die vermittelnden intrazellulären Signaltransduktionswege der Postkonditionierung besser untersucht und nachvollzogen werden. Einer der bisher bekannten Signaltransduktionswege beinhaltet die PI3K/AKT (Phosphoinositid-3-Kinase/ Proteinkinase B) ^[8-10]. Vor kurzem wurde bekannt, dass Pim-1 Kinase (Proviral Insertion site for Moloney Murine Leukemia Virus) ein Zielprotein von PI3K/AKT ist^[11] und bei Überexpression antiapoptotische^[11] und antihypertrophische^[12] Effekte sowie eine Infarktgrößenreduktion^[11] vermittelt. Des Weiteren zeigte sich in Experimenten, dass mit Pim-1 gentechnisch veränderte kardiale

Stammzellen zu besserer Überlebensfähigkeit, einer besseren Proliferation sowie verbesserter Regeneration nach einem akuten Myokardinfarkt führten^[13]. Die Beteiligung der Pim-1 Kinase an der intrazellulären Vermittlung der ischämischen und Desfluran-induzierten Präkonditionierung wurde 2009 erstmals beschrieben^[14]. Aufgrund dieser Hinweise wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Pim-1 Kinase eine Rolle bei der Anästhetika-induzierten sowie bei der ischämischen Postkonditionierung spielt.

1.1 Postkonditionierung

Die Postkonditionierung bezeichnet einen Prozess, bei dem ein Ereignis oder mehrere Ereignisse, welche einer ischämischen Phase unmittelbar folgen, eine phänotypische Veränderung im Kardiomyozyten hervorrufen und so die Toleranz der Zelle gegenüber dem schädigenden Einfluss des I/R-Schadens erhöhen. Entscheidend ist dabei, dass das Ereignis in der frühen Phase der Reperfusion stattfindet^[15]. Die Postkonditionierung kann sowohl durch kurze Zyklen von Ischämie/Reperfusion (ischämische Postkonditionierung) als auch durch Pharmaka (pharmakologische Postkonditionierung) induziert werden. Zur pharmakologischen Postkonditionierung können Substanzen wie zum Beispiel Bradykinin^[16], Adenosinrezeptorantagonisten^[16], Insulin^[17], Statine^[18], Opioide^[19], Cyclosporin^[20] und volatile Anästhetika^[8, 21-25] eingesetzt werden.

Im Gegensatz zu Postkonditionierung bezeichnet die Präkonditionierung einen Prozess bei dem ein oder mehrere Ereignisse einer ischämischen Phase vorausgehen. Ischämische Präkonditionierung, ein endogener Schutzmechanismus, wurde erstmals 1986 von Murry et al. bei Experimenten an Hunden entdeckt^[26]. In diesen Experimenten gelang eine Infarktgrößenreduktion von 75% durch 4 Zyklen einer 5-minütigen Koronararterienokklusion, welche vor einer koronaren Okklusion von 40 Minuten Dauer durchgeführt wurden. Da die Präkonditionierung jedoch vor dem Infarkt ereignis angewendet werden muss, ist ihre klinische Anwendung schwierig. Daher entwickelte sich analog zur ischämischen Präkonditionierung das Konzept der

ischämischen Postkonditionierung, welches nach stattgehabtem Infarkt ereignis und somit mit möglicher therapeutischer Implikation eingesetzt werden kann.

1.1.1 Ischämische Postkonditionierung

Der Schutzmechanismus der Zelle, welcher nach einer stattgehabten Ischämie durch kurze Zyklen von Unterbrechung der Blutzufuhr (Ischämie) und nachfolgender Durchblutung (Reperfusion) ausgelöst werden kann, wird als ischämische Postkonditionierung bezeichnet. Dieses Phänomen wurde von Zhao et al. 2003 entdeckt und als ischämische Postkonditionierung (IPOST) bezeichnet^[27]. In dieser Studie zeigte die Arbeitsgruppe an einem Hundemodell, dass unmittelbar nach einer Ischämie von 60 Minuten mit Hilfe von 3 Zyklen einer 30sekündigen Ischämie und Reperfusion eine Verringerung der Größe des Myokardinfarkts um 44% erreicht werden kann^[27]. In folgenden Spezies wurde IPOST bisher nachgewiesen: Hunde^[27], Schweine^[28], Kaninchen^[29], Ratten^[9, 30, 31] und Mäuse^[32-34]. Staat et al. zeigten 2005, dass auch beim Menschen Postkonditionierung existiert^[35]. Die Länge und Anzahl der Zyklen, welche angewendet werden müssen, um eine Postkonditionierung auslösen zu können, unterscheidet sich jedoch zwischen den verschiedenen Spezies. Dabei scheint jedoch die Länge der Reperfusion-Ischämiezyklen wichtiger zu sein als die Anzahl der Reperfusion-Ischämiezyklen^[36]. Im Vergleich der ischämischen Prä- und Postkonditionierung durch Redel et al. konnte an Mäusen jedoch kein signifikanter Unterschied in der Effektivität beider Phänomene nachgewiesen werden^[32].

1.1.2 Anästhetika-induzierte Postkonditionierung

Im Jahre 1997 zeigte Schlack et al. die kardioprotektiven Eigenschaften von volatilen Anästhetika während der frühen Reperfusion^[37]. Kaninchen wurden zunächst einer 30-minütigen Koronarokklusion und anschließend einer 2-stündigen Reperfusion unterzogen. In der während der Reperfusion konditionierten Halothangruppe verkleinerte sich dadurch die Größe des Myokardinfarkts von 49% (CON) auf 32 %^[37]. Dieses Phänomen wurde später als Anästhetika-induzierte Postkonditionierung (APOST)^[8] bezeichnet. Chiari et al. konnten 2005 in ihrer Studie bei Applikation von

Isofluran eine signifikante Reduktion der Größe des Myokardinfarkts^[8] zeigen. Auch in weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass APOST die Infarktgröße reduziert^[32, 38]. Dass auch der linke Ventrikel im Bezug auf seine Funktion von APOST profitiert stellte Deyhimy et al. dar. Die Autoren verglichen Anästhetika-induzierte Prä- und Postkonditionierung und stellten fest, dass beide sich durch eine Senkung des linksventrikulären Drucks positiv auswirkten^[39]. 2008 zeigten Lemoine et al., dass APOST auch beim Menschen nachweisbar ist^[40]. Ob man bei der APOST jedoch Isofluran, Sevofluran oder Desfluran verwendet, scheint für die Reduktion der Infarktgröße nach bisherigen Erkenntnissen im Mausmodell keine Rolle zu spielen^[32].

1.1.3 Signaltransduktion der Postkonditionierung

APOST und IPOST werden beide als wirkungsvolle kardiale Protektionsmechanismen angesehen, welche zu einer Reduktion des Reperfusionsschadens führen. Die komplexen Mechanismen, die den protektiven Effekten der APOST und IPOST zugrunde liegen, werden über verschiedene Signaltransduktionswege vermittelt, in denen antiapoptotische Kinasen^[9, 21], ATP sensitive Kaliumkanäle^[16, 22] und die mPTP^[22, 41] eine Rolle spielen. Einer dieser Signaltransduktionswege ist der RISK(Reperfusion-Injury-Salvage-Kinase)-Signaltransduktionsweg^[42]. Der RISK-Signaltransduktionsweg, welcher sowohl bei Prä- als auch bei Postkonditionierung durchlaufen wird, besteht aus einer Kaskade von Kinasen, welche das Überleben der Zelle fördern. Dabei werden zwei verschiedene Kaskaden bei der Postkonditionierung angestoßen: die Kaskade, die über die Kinase Erk1/2, und eine zweite, die über PI3K/Akt abläuft^[43]. Letztere wird in dieser Arbeit genauer betrachtet, da die Pim-1 Kinase in Kardiomyozyten ein Zielprotein von PI3K/Akt ist^[11]. Wird PI3K/Akt durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert, so wird eine Kaskade angestoßen und nachfolgend auch die Pim-1 Kinase, eine Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase (CAMK)^[44], als Zielprotein von PI3K/AKT in Kardiomyozyten aktiviert^[11]. Die Pim-1 Kinase wiederum aktiviert unterschiedliche Zielproteine^[45]. Unter anderem befindet sich darunter auch das Bad-Protein^[45]. Bad ist ein proapoptotisches Protein und wird durch Pim-1 Kinase spezifisch an Serin112 phosphoryliert^[45]. Bad wird durch diese

Einleitung

Phosphorylierung inaktiviert und somit erhöht sich die Aktivität des antiapoptotischen Proteins Bcl-2^[45]. Die Aktivierung von Bcl-2 verhindert ihrerseits wiederum die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium in das Zytosol^[46]. Wird Cytochrom C freigesetzt so bildet es mit inaktiver Caspase 9 sowie anderen Cofaktoren (ATP, Afap-1 (Apoptotic protease activating factor-1)) einen Komplex. Den Komplex bezeichnet man als Apoptosom^[47]. Die Bildung des Apoptosoms führt zur autokatalytischen Spaltung der Caspase 9 und damit zur Aktivierung der Effektorcaspase 3. Den Endpunkt dieser Kaskade stellt die Apoptose der Zelle dar^[47, 48]. Ist Cytochrom C erst einmal freigesetzt so ist der Vorgang irreversibel und es kommt zur endgültigen Einleitung der Apoptose^[47]. (Abbildung 1)

Durch einen Ischämie-Reperfusionsschaden können am Herzen inflammatorische Prozesse, Apoptose sowie Nekrose ausgelöst werden. Die Aktivierung des RISK-Signaltransduktionsweges stellt somit eine Möglichkeit des Kardiomyozyten dar, sich vor dem ischämie-/reperusionsbedingten Zelltod zu schützen.

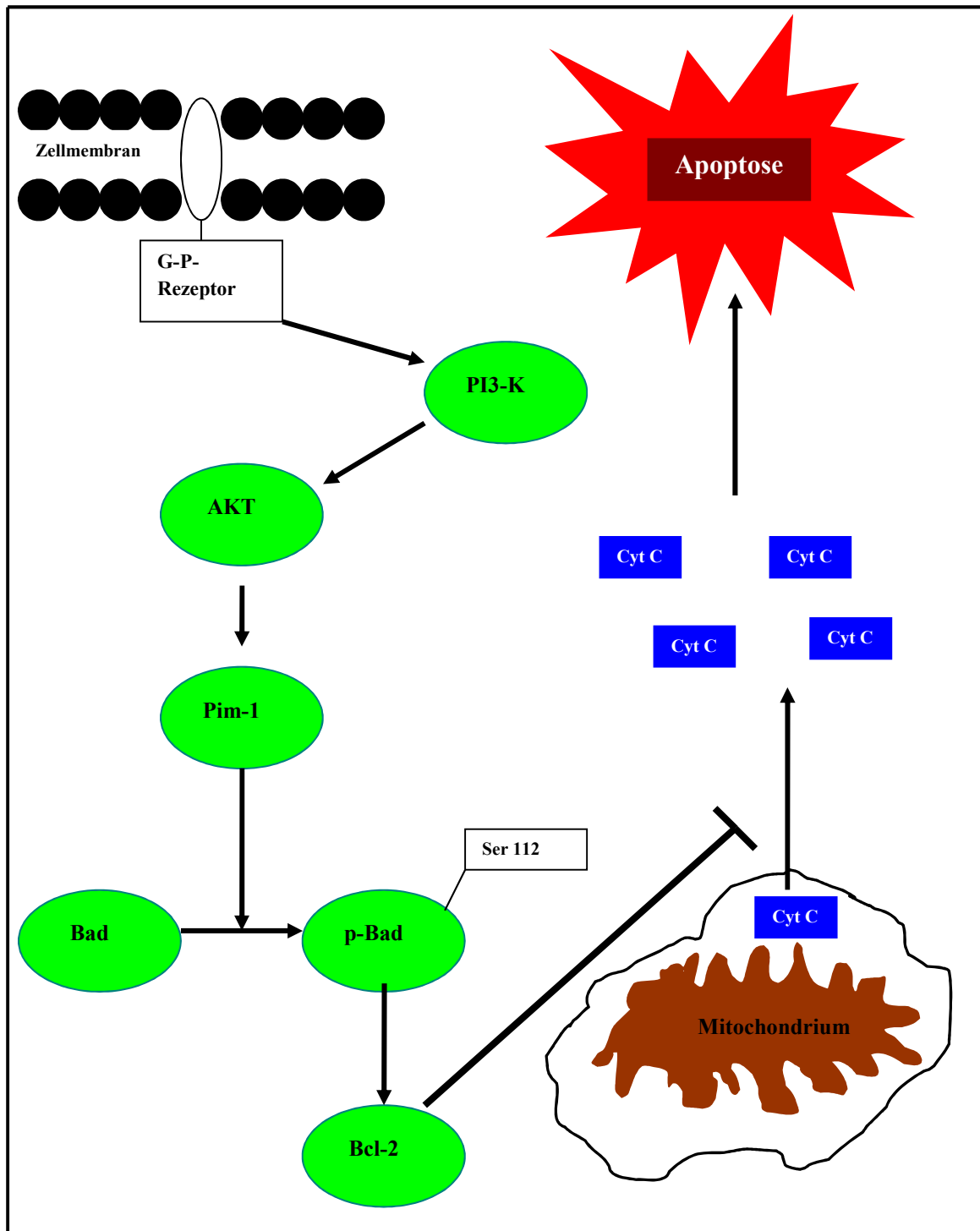


Abbildung 1: Schematische Darstellung des über die Pim-1 Kinase vermittelten Signaltransduktionswegs der ischämischen und Desfluran-induzierten Postkonditionierung^[42, 45, 46, 49] (Details siehe Text): G-P-Rezeptor: G-Protein gekoppelter Rezeptor; PI3-K: Phosphoinositol-3-Kinase; AKT: Proteinkinase B; Ser¹¹²: Serin¹¹²; Cyt C: Cytochrom C

1.1.3.1 Die Pim-1 Kinase – eine Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase

Pim-1 - Proviral Insertion site for Moloney Murine Leukemia Virus – ist ein Protoonkogen, das ursprünglich zufällig bei Experimenten zur Entdeckung neuer Gene, die in der Tumorgenese eine Rolle spielen, gefunden wurde^[50, 51]. Beim Menschen ist es auf Chromosom 6 lokalisiert und kodiert für ein 33kD Protein. Bei Mäusen hingegen ist es auf Chromosom 17 lokalisiert und kodiert für zwei gleichnamige Proteine unterschiedlicher Größe: 33kD und 44kD^[52]. Pim-1 Kinase gehört zur Familie der Calcium/Calmodulin-abhängige Kinasen^[44] und zusammen mit Pim-2 und Pim-3 zur Familie der Serin/Threonin Kinasen^[53]. Diese sind aus einem ATP-Anker und einer aktiven Seite aufgebaut^[44] und können sich an Serin¹⁹⁰, Threonin²⁰⁵ sowie Serin⁴ autophosphorylieren^[54-56]. Die Pim-1 Kinase wird in Zellen unterschiedlichster Art exprimiert^[57]. Besonders stark ist ihre Expression beim Menschen während der fetalen Entwicklung in der Leber und der Milz^[58]; bei Mäusen wird Pim-1 während ihrer Entwicklung besonders stark im Gehirn sowie im zentralen Nervensystem ausgeprägt^[57]. In Kardiomyozyten wird Pim-1 während der Neonatalzeit stark exprimiert, mit der Zeit sinkt der Gehalt an Pim-1 in Kardiomyozyten kontinuierlich ab. Im Gegensatz dazu sind die Isoformen Pim-2 und Pim-3 in Kardiomyozyten nur gering ausgeprägt. In Kardiomyozyten junger Mäuse findet die Expression von Pim-1 hauptsächlich im Nukleus statt, später dagegen verlagert sich die Expression hauptsächlich ins Zytosol^[11], wo Pim-1 verschiedene Proteine reguliert^[59]. Pim-1 Kinase kann über Zytokin-Signaltransduktionswege^[44, 53] und Wachstumsfaktoren^[44] aktiviert werden. Sie interagiert mit vielen verschiedenen Proteinen und aktiviert bzw. inaktiviert dabei Signalwege unterschiedlichster Art^[44]. In Zellen des Myokards nimmt die Pim-1 Kinase zum Beispiel Einfluss auf die Proteine Bcl-x1, Bcl-2, Bad, Cdc25a, Cdc25c, p21 und SERCA2a^[11-13, 59, 60]. Über diese Interaktionen wirkt sie zum Beispiel auf die Kontraktilität des Herzens^[12] und hat einen kardioprotektiven Einfluss^[11, 59]. Weitere Wirkungen der Pim-1 Kinase am Myokard sind in Abbildung 2 beschrieben. Besonders interessant ist die Interaktion mit dem Protein Bad^[45]. Über die Phosphorylierung an Serin112, welche zur Inaktivierung führt und damit die Aktivität von Bcl-2 erhöht, entfaltet die Pim-1 Kinase anti-apoptotische Effekte^[45].

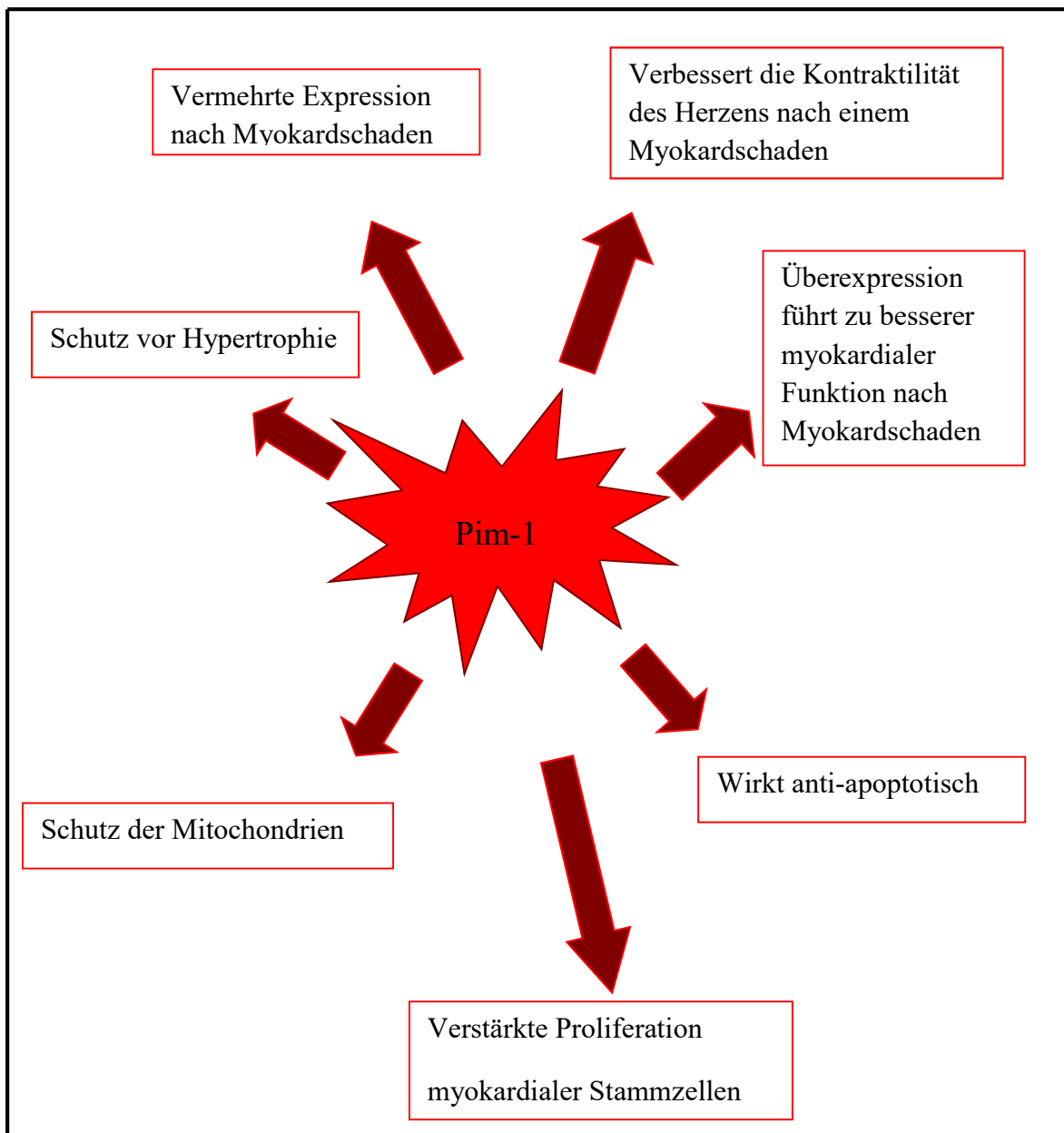


Abbildung 2: Wirkungen der Pim-1 Kinase am Myokard^[11-13, 59, 60]

1.1.4 Postkonditionierung in klinischen Studien

Die erste klinische Studie zur ischämischen Postkonditionierung führten Staat et. al an 30 Patienten durch, welche einen akuten Myokardinfarkt aufwiesen. Eine Minute nach Einsetzen des Stents wurde ein Ballon proximal des Stents platziert, welcher viermal für eine Minute mit 4 – 6 atm aufgeblasen wurde und damit die Koronararterie verschloss.

Einleitung

Damit wurde eine Infarktgrößenreduktion von 36%^[35] erreicht. Wenig später konnten auch Laskey et al. eine Begrenzung des Ischämie/Reperfusionsschadens sowie eine Verbesserung der myokardialen Perfusion nachweisen^[61]. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass ischämische Postkonditionierung zu einer Reduktion der CK-Ausschüttung führte und über SPECT konnte in mehreren Studien eine Infarktgrößenreduktion nachgewiesen werden^[62-64]. Eine erste follow-up-Studie wurde 2008 von Thibault et al. veröffentlicht. Die Autoren wiesen nach, dass bei Patienten, welche mit IPOST behandelt worden waren, nach 6 Monaten der Defekt am Myokard geringer ausfiel und sie nach einem Jahr eine bessere linksventrikuläre Ejektionsfraktion hatten als die Vergleichsgruppe^[65]. Wang et al. stellten fest, dass mehrfaches (> 3) Aufdehnen durch den Ballon während der Koronarangioplastie besser wirkte als ein- bis zweimaliges Aufdehnen^[66]. Des Weiteren setzten Lonborg et. al. die ST-Strecken-Rückbildung in Kombination mit einem Kardio-MRT zur Beurteilung der Patienten nach IPOST ein. Die Autoren konnten zeigen, dass IPOST zu einer verbesserten ST-Streckenrückbildung führte. Mittels Kardio-MRT konnte demonstriert werden, dass Infarktgröße und funktionelle Parameter bei Patienten mit kompletter ST-Strecken-Rückbildung besser ausfielen^[67]. Die erste Studie, die das klinische Outcome der Patienten über 3 Jahre verfolgte, zeigte, dass eine Reduktion der Infarktgröße, eine bessere epikardiale und myokardiale Durchblutung sowie eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion auch noch 3 Jahre nach IPOST nachweisbar waren^[68]. Zur APOST gibt es bisher eine Studie von Lemoine et al., die einen positiven Effekt einer Applikation von Desfluran während der Reoxygenierung an menschlichem Myokard in vitro nachweist^[40]. Des Weiteren führten Lavi et al. eine klinische Studie zur Postkonditionierung mit Sevofluran bei akutem Myokardinfarkt durch^[69]. Darin zeigte sich bei Patienten mit anteriorem Myokardinfarkt, welche Sevofluran während der Perkutanen Coronaren Intervention (PCI) erhalten hatten, eine Tendenz zur Verkleinerung der Infarktgröße^[69].

1.2 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wird die Rolle der Pim-1 Kinase bei der Vermittlung der ischämischen und der Desfluran-induzierten Postkonditionierung untersucht. Zur Untersuchung wird ein in vivo Herzinfarktmodell der Maus verwendet. Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es, die Hypothesen zu testen, dass

1. die Pim-1 Kinase an der Vermittlung sowohl der ischämischen als auch der Desfluran-induzierten Postkonditionierung beteiligt ist.
2. die Pim-1 Kinase dabei Einfluss auf die apoptotischen Signaltransduktionswege nimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Durchführung der Untersuchung

2.1.1 Versuchsgenehmigung

Ein Antrag auf Durchführung eines Tierversuchsvorhabens wurde bei der Regierung von Unterfranken gestellt und genehmigt (AZ 43/09). Alle Experimente wurden in Einklang mit den Richtlinien für Labortiere^[70] und den Richtlinien für den Tierschutz der amerikanischen physiologischen Gesellschaft durchgeführt.

2.1.2 Versuchstiere

Für die Versuche wurden 10 – 12 Wochen alte männliche C57BL/6 Mäuse verwendet, welche von Harlan Laboratories (Horst, Niederlande) bezogen wurden. Die Mäuse erhielten Wasser und Standardlaborfutter ad libitum. Die Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen gehalten: 22 ° Celsius, 55 – 65 % Luftfeuchtigkeit, 12 Stunden Tag-Nacht Zyklus.

2.1.3 Narkose und Beatmung

Zur Einleitung der Narkose erhielten die Mäuse eine intraperitoneale Injektion von 60 mg/kg Körpergewicht Natrium-Pentobarbital (Merial, Hallbergmoos, Deutschland). Um die Anästhesie aufrechtzuerhalten, erhielten sie je nach Bedarf wiederholte intraperitoneale Injektionen von 15 mg/kg Körpergewicht Natrium-Pentobarbital. Die adäquate Anästhesietiefe wurde durch engmaschige Kontrolle des Wegziehreflexes der Pfote des hinteren Beins überprüft. Zur Kontrolle der Herzfrequenz sowie EKG-Veränderungen wie zum Beispiel Hebungen der ST-Strecke wurde allen Tieren ein 3-Kanal-Elektrokardiogramm angelegt. Die Körpertemperatur wurde mit Hilfe einer rektalen Temperatursonde und des beheizbaren Operationstisches, welcher über einen

Regelkreis die Körpertemperatur der Tiere konstant auf $37,0\pm 0,1^{\circ}$ Celsius hielt, überwacht.

Die Mäuse wurden in Rückenlage auf dem beheizbaren Operationstisch (FMI, Seeheim, Deutschland) platziert. Die orotracheale Intubation erfolgte, indem eine 22-gauge Verweilkanüle (BD Insyte-W, Heidelberg, Deutschland) unter direkter Sicht in die Trachea eingeführt wurde. Die Kanüle wurde an ein Beatmungsgerät für Nagetiere (SAR 830 / AP, CWE Inc., Ardmore, PA) angeschlossen. Die Mäuse wurden während des gesamten Experiments mit einem Luftsauerstoffgemisch (50% Luft, 50% Sauerstoff) im Druck-Kontrollierten Modus mit einer Frequenz von circa 130 Atemzügen/Minute, einem maximalen Atemwegsdruck von 30 cm H₂O und einem positiven endexpiratorischen Druck von 1 – 3 cm H₂O beatmet.

2.1.4 Präparation

Zunächst wurde über eine Mittellinieninzision des Halses die rechte Arteria carotis communis freigelegt. Nach Unterbinden der Blutzufuhr mit einem Seidenfaden wurde die rechte Arteria carotis communis vorsichtig inzidiert und ein mit Kochsalz gefüllter Polyethylen (PE)-10 Katheter, welcher an einen Druckwandler (Combitrans, B. Braun, Melsungen, Deutschland) angeschlossen wurde, in die A. carotis communis eingebracht und mit einem 6-0 Seidenfaden fixiert. Der Katheter diente zur Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks. Des Weiteren wurde zur Kontrolle des Flüssigkeitshaushalts ein Katheter in die rechte Vena jugularis gelegt. Die Flüssigkeitssubstitution mit Vollelektrolytlösung (Sterofundin, Braun AG, Melsungen) betrug 20µl/g/h.

Die weiteren Schritte wurden mit Hilfe eines Stereomikroskopes (OPMI-9-FC, Zeiss, Jena, Deutschland), welches eine 3,5- bis 10-fache Vergrößerung ermöglicht, durchgeführt. Es wurde eine linksseitige Thorakotomie im 4. Interkostalraum durchgeführt. Muskulus Pectoralis major und minor wurden jeweils an ihren Ursprüngen abgetrennt und verlagert. Nach Penetration und Loslösen der Interkostalmuskeln sowie der Pleura wurde die vierte Rippe von sternal abgesetzt, so dass das gesamte Herz sichtbar wurde. Das Perikard wurde mit zwei Pinzetten stumpf

eröffnet. Nach Identifizierung des absteigenden Astes der linken Koronararterie (LAD – left anterior descending coronary artery) wurde dieser mit einem Seidenfaden umstoßen. Beide Fadenenden wurden durch ein PE-10 Silikonröhrchen mit 2mm Durchmesser geführt, um dadurch eine Schlinge zu erhalten.

2.1.5 Induktion der myokardialen Ischämie

Zur Einleitung der myokardialen Ischämie wurden an beiden Enden des Fadens, welcher als Schlinge um die linke Koronararterie gelegt worden war, Gewichte von je 1g befestigt. Beide Fadenenden wurden jeweils über eine Stange geführt. Durch das Anheben der Stangen zog sich die Schlinge zu und die Okklusion der Koronararterie wurde ermöglicht. Die Ischämie wurde durch die Blässe des Myokards, die Farbänderung der Koronararterie von rötlich zu leicht violett sowie ST-Hebungen im EKG verifiziert. Durch Absenken der Stangen öffnete sich die Schlinge und führte zur Reperfusion, welche durch erneuten Farbwechsel der Koronararterie, epikardiale Hyperämie des Myokards und Verschwinden der ST-Hebungen sowie Auftreten von ST-Streckensenkungen bestätigt wurde.

2.1.6 Beendigung des Experiments

Nach dreistündiger Reperfusionzeit wurde die Koronararterie erneut verschlossen und langsam 1ml Patentblau (0,1g/ml, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in die Arteria carotis injiziert. Der Farbstoff führte zu einer Separation von normal durchblutetem und ischämischem myokardialen Gewebe (= Area at Risk (AAR)). Anschließend wurde eine tödliche Dosis Natrium-Pentobarbital (150 µg/g) appliziert. Das Herz wurde von den Gefäßen abgetrennt und entnommen. Der linke Ventrikel wurde vom restlichen Herzen separiert und nach 20 Minuten Kühlung bei -20° Celsius mit Hilfe einer Acrylherzmatrix (Aster Industries, McCandles, PA) in sieben bis acht je 1 mm dicke Scheiben geschnitten. Bei einer Temperatur von 37° Celsius wurden die Scheiben für 30 Minuten in 2% 2,3,5-Triphenylazolium-Chlorid (TTC, 20mg/ml,

Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gelöst in 0,1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ Puffer (pH 7,4) eingelegt. Die Scheiben wurden über Nacht in 10% Formaldehyd (Fischer, Saarbrücken, Deutschland) fixiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Scheiben gewogen und mit einer hochauflösenden Digitalkamera (Finepix S3 Pro, Fujifilm, Tokyo, Japan) fotografiert.

2.1.7 Auswertung des Experiments

Mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop CS 8.0.1 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA) wurden die Photographien analysiert. Die drei Zonen normal durchblutete Zone, AAR und infarzierte Zone wurden durch ihre Farbe bestimmt und gravitoplanometrisch gemessen. Unversehrtes Myokard stellte sich blau, die AAR rot und der Bereich des Herzinfarkts weiß dar. Die Messungen führte eine geblindete Person durch. Versuchstiere, bei welchen die AAR kleiner als 20% des linken Ventrikels ausfiel, wurden aus der Studie ausgeschlossen.

2.2 Experimentelles Protokoll

Die Mäuse wurden in 7 Versuchsgruppen mit je 8 Tieren randomisiert, um den Einfluss der Pim-1 Kinase auf die ischämische und Desfluran-induzierte Postkonditionierung zu untersuchen. (Abbildung 3)

Nach Ende der chirurgischen Maßnahmen erhielt jedes Tier eine 30-minütige Äquilibrationsphase (Baseline). Um eine myokardiale Ischämie auszulösen, wurde die Koronararterie für 45 Minuten verschlossen, anschließend folgte eine dreistündige Reperfusionzeit.

Gruppe 1 (CON): Tiere dieser Versuchsgruppe erhielten keine weitere Behandlung.

Gruppe 2 (DMSO): Tiere dieser Versuchsgruppe erhielten 5 Minuten vor Ende der Koronarokklusion 10µl/g Dimethylsulfoxid, um auszuschließen, dass Dimethylsulfoxid, das Lösungsmittel des Pim-Inhibitors, die Versuchsergebnisse beeinflusst.

Gruppe 3 (PIM-Inh. II): Tiere dieser Versuchsgruppe erhielten 5 Minuten vor Ende der Koronararterienokklusion den selektiven^[71] PIM-1-Kinase-Inhibitor 2-Hydroxy-3-cyano-4-phenyl-6-(3-romo-6-hydroxyphenyl)pyridin. (Pim-1-Kinase Inhibitor II, 10 µg/g, gelöst in DMSO; Merck, Darmstadt, Deutschland)

Gruppe 4 (DES): Tiere dieser Versuchsgruppe erhielten 18 Minuten Desfluran in einer Konzentration von 1,0 Minimaler alveolärer Konzentration (MAC, 7,5 Vol-%^[72]) beginnend 3 Minuten vor Beendigung der Koronararterienokklusion, um dem volatilen Anästhetikum ausreichend Zeit zur Anflutung vor dem Ende der Koronararterienokklusion zu geben. Damit wurde sichergestellt, dass bei Beginn der Reperfusion, welches den kritischsten Moment für den Erfolg der Postkonditionierung darstellt^[15], eine Konzentration von 1,0 MAC erreicht war.

Gruppe 5 (DES+PIM-Inh. II): Tiere dieser Versuchsgruppe erhielten 5 Minuten vor Ende der Koronarokklusion Pim-1-Kinase Inhibitor II (Pim-1-Kinase Inhibitor II, 10 µg/g, gelöst in DMSO; Merck, Darmstadt, Deutschland), sowie 18 Minuten Desfluran in einer Konzentration von 1,0 MAC mit Beginn 3 Minuten vor dem Ende der Koronararterienokklusion.

Gruppe 6 (IPOST): Tiere dieser Versuchsgruppe erhielten unmittelbar nach der Koronarokklusion je drei 10-sekündige Zyklen Ischämie und Reperfusion zur Induktion der ischämischen Postkonditionierung.

Gruppe 7 (IPOST+ PIM-Inh. II): Tiere dieser Versuchsgruppe erhielten 5 Minuten vor Ende der Koronararterienokklusion Pim-1-Kinase Inhibitor II (Pim-1-Kinase Inhibitor II, 10 µg/g, gelöst in DMSO; Merck, Darmstadt, Deutschland), sowie unmittelbar nach Koronararterienokklusion je drei 10-sekündige Zyklen Ischämie und Reperfusion.

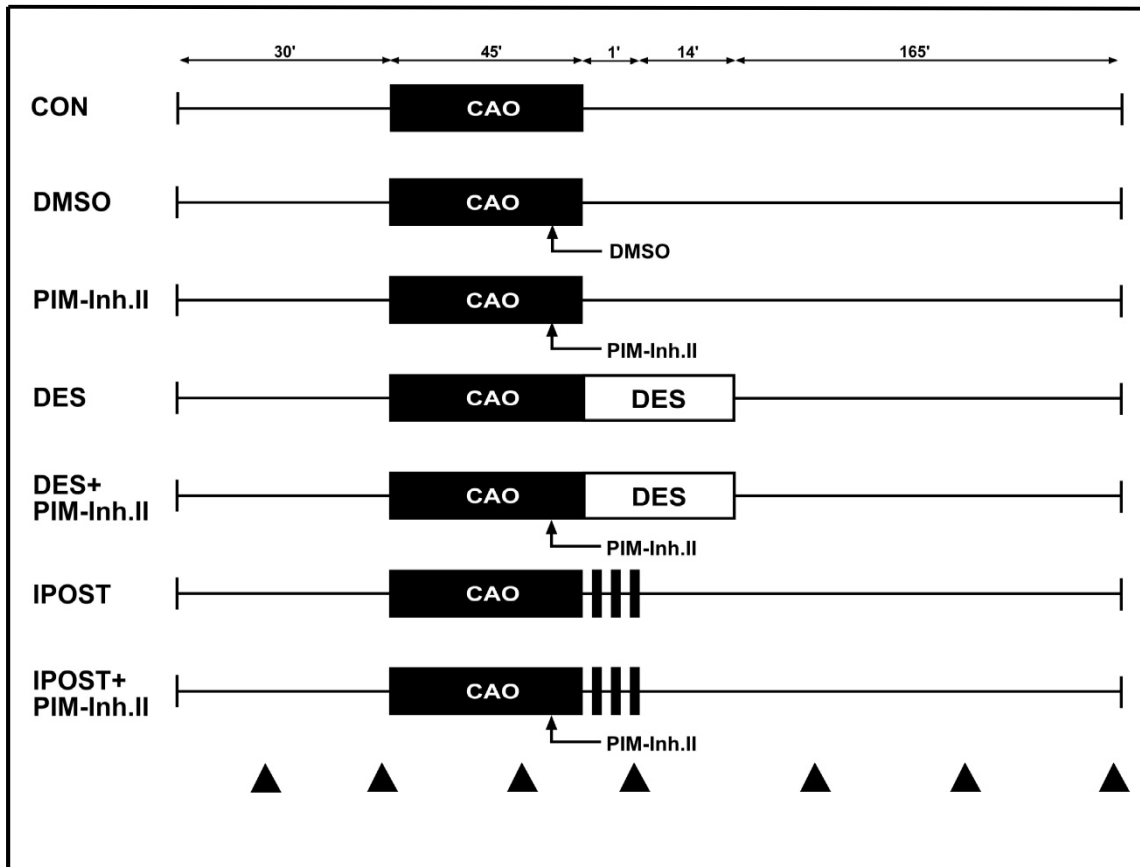


Abbildung 3: Schematische Darstellung des experimentellen Protokolls:

CAO = Koronararterienokklusion, CON = Kontrolle, DMSO = 10µl/g Dimethylsulfoxid, PIM-Inh. II = 10 µg/g 2-Hydroxy-3-cyano-4-phenyl-6-(3-bromo-6-hydroxyphenyl)pyridine, DES = 1,0 MAC Desfluran, DES+ PIM-Inh. II = 1,0 MAC Desfluran + 10 µg/g 2-Hydroxy-3-cyano-4-phenyl-6-(3-bromo-6-hydroxyphenyl)pyridine, IPOST = 3 Zyklen Ischämie/Reperfusion, IPOST+ PIM-Inh. II = 10 µg/g 2-Hydroxy-3-cyano-4-phenyl-6-(3-bromo-6-hydroxyphenyl)pyridine + 3 Zyklen Ischämie/Reperfusion (n = 8 pro Gruppe), ▲ Messung hämodynamischer Parameter (Herzfrequenz, Mittlerer arterieller Blutdruck)

2.3 Molekularbiologische Untersuchungen

2.3.1 Entnahme von Myokardgewebe

Zur molekularbiologischen Untersuchung wurde myokardiales Gewebe nach einer Stunde Reperfusion entnommen, um die Effekte der Pim-1 Kinase, Bad, Bcl-2 und die Phosphorylierung von Bad an Serin¹¹² mittels Westernblot zu testen. Die Phosphorylierung von Bad an Serin¹¹² diente dabei als Surrogatparameter der Pim-1 Kinase Aktivität^[45].

Narkose, Beatmung, Präparation und Überwachung der Herzkreislaufparameter wurden wie in dem Experiment zur Bestimmung der Myokardinfarktgröße durchgeführt. Eine Färbung mit Patentblau erfolgte nicht.

2.3.1.1 Protokoll zur Organentnahme

Die Mäuse wurden in 6 Gruppen zu je 4 Mäusen randomisiert.

Gruppe 1 (CON): Tiere dieser Versuchsgruppe erhielten keine weitere Behandlung.

Gruppe 2 (PIM-Inh. II): Tiere dieser Versuchsgruppe erhielten Pim-1-Kinase Inhibitor II.

Gruppe 3 (DES): Tiere dieser Versuchsgruppe erhielten Desfluran.

Gruppe 4 (DES+PIM-Inh.II): Tiere dieser Versuchsgruppe erhielten Desfluran in Kombination mit Pim-1-Kinase Inhibitor II.

Gruppe 5 (IPOST): Tiere dieser Versuchsgruppe erhielten IPOST.

Gruppe 6 (IPOST+PIM-Inh.II): Tiere dieser Versuchsgruppe erhielten IPOST in Kombination mit Pim-1-Kinase Inhibitor II

Nach einer Stunde Reperfusion wurden die Tiere mit einer letalen Dosis Pentobarbital euthanasiert und die Herzen der Tiere entnommen. Der linke Ventrikel des jeweiligen Herzens wurde unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° Celsius bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

2.3.2 Herstellung der Proben

Zur Herstellung der jeweiligen Proben wurde ein Stückchen Gewebe zusammen mit eiskaltem RIPA-Puffer in ein Eppendorfgefäß gegeben. Bei phospho-Proben wurde zusätzlich Proteaseinhibitor (Complete mini, Roche diagnostics, Mannheim, Deutschland), 20 mM NaF (Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und 1mM Natriumvanadat (Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) hinzugefügt. Nachfolgend wurden die Gewebestückchen mit einem Glasstab und passendem Glaszylinder (Homogenisator IKA RW14 basic, IKA Werke, Staufen) homogenisiert. Die Proben wurden bei 4 ° Celsius und 12000 g (Sepatech Megafuge 1,0R Heraeus) zentrifugiert. Cytosolische und korpuskuläre Zellfraktionen wurden für die Analyse per Westernblot nicht getrennt. Der Überstand wurde in Eppendorfgefäße überführt und bis zum nächsten Gebrauch bei -80° Celsius aufbewahrt.

Verwendete Lösungen:

PBS (Phosphate buffered saline) (5-fach) pH 7,2

41,17 g Na₂HPO₄ (Merck KGaA, Darmstadt)
11,73 g NaH₂PO₄ (Merck KGaA, Darmstadt)
20 g NaCl (Sigma Chemie GmbH, Steinheim)
930 ml H₂O (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg)

RIPA-Puffer

97,5 ml PBS
1 ml Igepal CA-630 (Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
0,5% Sodium Desoxycholic Acid (Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
0,1% Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamid (Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

2.3.3 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Um die Konzentration des gesamten Proteins einer Probe zu messen, wurde die Konzentrationsbestimmung nach Bradford^[73] benutzt. Dabei verändert sich das Absorptionsmaximum des Coomassie-brilliant-Blau von 465nm auf 595nm durch die Bindung von Coomassie-brilliant-Blau an Proteine. Aus dieser Verschiebung des Absorptionsmaximums lässt sich die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe errechnen.

1µl Lysat, 800µl H₂O und 200µl Bradford-Reagenz wurden in eine Kunststoffküvette pipettiert. Nachfolgend wurden die Lösungen gemischt. Die Absorption wurde bei 595nm spektrometrisch unter Zuhilfenahme des Computers HP620 (Hewlett Packard) gemessen. Die Konzentration der Proteine wurde mit einer Standardkurve bestimmt.

2.3.4 Probenvorbereitung

Aus dem Bradford-Protokoll wurde die notwendige Probenmenge berechnet, um 100µg Gesamtprotein in ein Eppendorfgefäß pipettieren zu können. Anschließend wurden die Gefäße bis 20µl mit RIPA bzw. p-RIPA aufgefüllt und jeweils 20µl Lämmli-puffer (BioRad, Hercules, CA, USA) mit 0,5% β -Mercapto-Ethanol (Sigma, Steinheim) zugegeben. Zur Denaturierung wurden die Eppendorfgefäße für 5 Minuten bei 95° Celsius in einen Heizblock (Techne, Dri-Block DB-2A, Cambridge, UK) gestellt. Danach wurden die Eppendorfgefäße mit denaturierter Probe in eine Zentrifuge (Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg) gestellt und 3 Minuten bei 10000 U/m zentrifugiert.

2.3.5 Gelelektrophorese

Die Proteine wurden mit Hilfe eines SDS (Sodium-dodecyl-Sulfat)-Gels nach Molekulargewicht aufgetrennt. Dazu wurde zunächst ein 15%-iges Trenngel hergestellt und zwischen zwei Glasplatten mit 1,5mm Spacer (BioRad Laboratories GmbH,

München), welche in einem Gestell (BioRad Laboratories GmbH, München) befestigt waren, gegossen. Der frei gebliebene Spalt zwischen den Glasplatten wurde mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Nachdem das Trenngel fest geworden war, wurde das destillierte Wasser abgegossen und ein 5%-iges Sammelgel vorbereitet. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegeben; 1,5 mm dicke 10-well Kämmen wurden vorsichtig eingesetzt, ohne Luftblasen entstehen zu lassen. Die Kämmen wurden, nachdem das Trenngel polymerisiert hatte, entfernt. Die Probentaschen wurden mit destilliertem Wasser gereinigt.

Für die Elektrophorese wurden die Gele in eine Elektrophoresekammer (Mini-PROTEAN 3 BioRad Laboratories GmbH, München) eingebracht. Der Bereich zwischen den Gelen wurde mit Elektrophorese-Puffer gefüllt. Die Probentaschen wurden mit Hilfe einer Pipette mit den vorbereiteten Proben befüllt. Dabei wurden in die erste und letzte Tasche 3 µl Proteinmarker (peqGOLD Protein-Marker V (Prestained) PeQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) gegeben, um die Größe der Proteine zu bestimmen. Nachfolgend wurde der Rest der Elektrophoresekammer mit Elektrophorese-Puffer aufgefüllt. Die Kammer wurde an eine Stromquelle (PowerPac HC High-Current Power Supply, BioRad Laboratories GmbH, München) angeschlossen. Bis die Proben das Sammelgel passiert hatten, wurde die Stromquelle auf eine Spannung von 90 V eingestellt. Danach wurde die Stromspannung auf 140 V erhöht. Die Kammer blieb solange an die Stromquelle angeschlossen, bis die Proben das Ende des Trenngels erreicht hatten.

Herstellung des Trenngels (15%)

2,35 ml H₂O

2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8 (Tris ultrapure AppliChem GmbH, Darmstadt)

100 µl 10% SDS

5 ml Acrylamide/Bis (30:2) (Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe)

50 µl APS

5 µl TEMED (Sigma Chemie GmbH, Steinheim)

Herstellung des Sammelgels (5%)

- 2,85 ml H₂O
- 1,25 ml 0,5 M Tris pH 6,8 (Tris ultrapure AppliChem GmbH, Darmstadt)
- 50 µl 10% SDS
- 850 µl Acrylamide/ Bis (30:2) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)
- 25 µl 10% APS
- 5 µl TEMED (Sigma Chemie GmbH, Steinheim)

Herstellung des Elektrophorese-Puffers (5-fach) pH 8,3

- 15 g Tris (Tris AppliChem GmbH, Darmstadt)
- 72 g Glycin (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)
- 5 g SDS
- 900 ml H₂O

2.3.6 Westernblot

Um die Proteine auf einer Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0,2 µl, Protran, Whatman Schleicher & Schuell, Dassel) zu fixieren, wurde das Wetblot-Verfahren angewendet.

In einer Halterung wurden die einzelnen Bestandteile in folgender Reihenfolge geschichtet:

- mit Transfer-Puffer getränkte Fasermatte
- mit Transfer-Puffer getränktes Blotting-Papier (330g/m²)
- Trenngel (das Sammelgel wurde zuvor abgeschnitten und verworfen)
- Nitrocellulose-Membran, zuvor in Transfer-Puffer gelegt
- mit Transfer-Puffer getränktes Blotting-Papier
- mit Transfer-Puffer getränkte Fasermatte.

Für das Wetblot-Verfahren wurde die Halterung in eine Transferkammer eingesetzt. Die Kammer wurde mit Transfer-Puffer befüllt. Bei 250mA wurden die aufgetrennten Proteine über Nacht bei 4° Celsius auf die Membran geblottet.

Herstellung des Transferpuffers

200 ml Elektrophorese-Puffer (5-fach)

200 ml Methanol (Merck KGaA, Darmstadt)

600 ml H₂O

Am Folgetag wurden die Membranen vorsichtig aus der Halterung herausgenommen. Um den unspezifischen Hintergrund zu blockieren, wurden die Membranen bei Raumtemperatur für eine Stunde in eine Lösung aus 2,5% entfettetem Milchpulver, 2,5% Albuminpulver aus Rinderserum und phosphat-gepuffertem saline-Tween 20 gelegt.

2.3.7 Antikörper-Inkubation

Nach Blockade wurden die Membranen aus der Lösung genommen und vorsichtig zwischen zwei Folien eingeschweißt. In den Raum zwischen beiden Folien wurde eine Lösung aus 2,5% entfettetem Milchpulver, 2,5% Albuminpulver aus Rinderserum, Phosphat gepuffertem saline-Tween 20 und der gewünschten Konzentration eines spezifischen Antikörpers gegeben und auf einen Schüttler (Heidolph, Duomax 1030) gestellt. Die Membranen wurden mit folgenden Erstantikörpern in der jeweiligen Konzentration inkubiert: Anti-Pim-1-Kinase 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Anti-Bad 1:100 (Abcam, Cambridge, Großbritannien), Anti-phospho-Bad 1:500 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), Anti-Bcl-2 1:500 (Abcam, Cambridge, Großbritannien), Anti-GAPDH aus der Maus 1:3000 (Millipore, Billerica, MA, USA) und Anti-Crystallin aus der Maus 1:3000 (Assay Designs, Ann Arbor, MI, USA). Anti-GAPDH und Anti-Crystallin wurden als Ladekontrollen verwendet. Auf Grund der unterschiedlichen Molekulargewichte der Antikörper musste für Anti-Pim-1-Kinase Anti-Crystallin als Ladekontrolle benutzt werden, während für alle anderen Erstantikörper Anti-GAPDH zur Verfügung stand.

Nach Inkubation wurden die Membranen dreimal für fünf Minuten auf dem Schüttler mit PBS-Tween gespült.

Als Zweitantikörper kam ein an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelter Antikörper zum Einsatz. Die Membranen wurden mit dem 2. Antikörper, welcher gegen die

Spezies des Erstantikörpers (Anti-Maus Ig-G (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland), Anti-Kaninchen Ig-G (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland)) gerichtet war, bei einer Konzentration von 1:5000 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Dann erfolgte erneut eine dreifache Spülung der Membranen von fünf Minuten Dauer mit PBS-Tween.

2.3.8 Entwicklung

Um die Proteinbanden sichtbar zu machen wurden ECL Detektionsreagenz (GE Healthcare, Freiburg) sowie ein Röntgenfilm benutzt. Dieser wurde an den Stellen geschwärzt, an denen eine Chemolumineszenzreaktion des in ECL enthaltenen Luminol stattgefunden hatte. ECL besteht aus zwei Reaktionslösungen. Diese wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Membranen wurden damit übergossen und für eine Minute inkubiert. Zwischen zwei Blotting-Papieren wurden die Membranen vorsichtig abgetrocknet und zusammen mit einem Röntgenfilm (Fuji medical X-Ray film, Düsseldorf, Deutschland) in eine Röntgenkassette (Dr. Goos Suprema, Heidelberg, Deutschland) gelegt. Zum Entwickeln des Röntgenfilms wurde ein Röntgenfilmentwickler (Kodak X-omat 2000, Kodak, New York, USA) benutzt.

2.4 Auswertung

Körpertemperatur, hämodynamische Parameter und EKG wurden mit einer dafür geeigneten Software (Notocord hem 3.5, Croissy sur Seine, Frankreich) auf einem Personal Computer (Fujitsu Siemens, Augsburg, Deutschland) aufgezeichnet und anschließend analysiert.

Um die durch den Western Blot entstandenen Banden auf dem Röntgenfilm zu beurteilen, wurden die Filme mit einem Fotoscanner (Epson Perfection, Epson, Meerbusch, Deutschland) gescannt und die Signalintensität jeder Bande densitometrisch mit Hilfe der ImageJ Software (NIH) bestimmt. Die Signalintensität jedes Proteins wurde durch die Expression der Ladekontrolle genormt. Für die Kontrollgruppe wurde der Wert 100% festgelegt.

2.5 Statistik

Aufgrund von Ergebnissen vorangegangener Studien mit dem gleichen Mausmodell^[74, 75] wurde in der Kontrollgruppe eine Infarktgröße von 50% (IS/AAR) erwartet. Die Poweranalyse ergab, dass eine Gruppengröße von n=8 benötigt wurde, um eine statistisch signifikante Reduktion der Mittelwerte von 15% mit einer Power von 0,8 bei einem Alpha-Fehler von 0,05 zu erreichen. Zur statistischen Analyse setzten wir die Analyse der Varianz (ANOVA) ein.

Die Analyse des Körpergewichts, des Gewichts des linken Ventrikels, des Verhältnisses von Gewicht des linken Ventrikels zum Körpergewicht, AAR, IS, IS/linker Ventrikel und AAR/linker Ventrikel wurde mit der einfaktoriellen Analyse der Varianz (CON vs. DMSO gegen PIM-Inh.II vs. DES vs. DES+PIM-Inh.II vs. IPOST vs. IPOST+PIM-Inh.II) sowie dem post-hoc Duncan`s-Test durchgeführt.

Die Analyse der Daten der Westernblots, welche wir aus der Bestimmung der Signalintensität erhielten, wurde ebenfalls mit einer einfaktoriellen Analyse der Varianz unter Berücksichtigung der Versuchsgruppe (CON vs. PIM-Inh.II gegen DES gegen DES+PIM-Inh.II gegen IPOST gegen IPOST+PIM-Inh.II) und eines post-hoc Duncan`s-Test durchgeführt.

Die hämodynamischen Daten wurden mit einer 7x7 Analyse der Varianz für wiederholte Messungen, einschließlich des Behandlungsfaktors (CON vs. DMSO gegen PIM-Inh.II vs. DES gegen DES+PIM-Inh.II gegen IPOST gegen IPOST+PIM-Inh.II) und des Zeitpunkts (Baseline vs. PreCAO gegen CAO gegen POST gegen Reperfusion von 60 min gegen Reperfusion von 120 min gegen Reperfusion von 180 min) analysiert. Bei Ermittlung signifikanter Daten wurde für jede Gruppe zu jedem Zeitpunkt eine post-hoc einfaktorielle ANOVA sowie eine Bonferronikorrektur von Alpha durchgeführt.

Zur statistischen Analyse benutzten wir die Software SPSS 16.0 (The Apache Software Foundation, Forrest Hill, MD). Änderungen des Mittelwerts wurden ab einem Wert von $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben.

3 Ergebnisse

Es wurden 86 Mäuse in die Studie eingeschlossen. 62 Versuchstiere wurden zur Durchführung der Ischämie/Reperfusionsexperimente instrumentiert, um 56 erfolgreiche Experimente zu erhalten. 6 Mäuse wurden auf Grund linksventrikulären Pumpversagens nicht in die Studie eingeschlossen (1 Tier der DMSO-Gruppe, 1 Tier der PIM-Inh. II – Gruppe, 1 Tier der DES + PIM-Inh. II – Gruppe, 1 Tier der IPOST – Gruppe sowie 2 Tiere der IPOST + PIM-Inh. II – Gruppe). 24 Tieren wurde nach Euthanasie das Herz entnommen, um mit Hilfe des Westernblot-Verfahrens die Proteinexpression zu messen.

	CON	DMSO	PIM-Inh. II	DES	DES + PIM-Inh. II	IPOST	IPOST + PIM-Inh. II
Anzahl n							
Ischämie/ Reperfusionsexperiment	8	8	8	8	8	8	8
Westernblot	4	-	4	4	4	4	4

Tabelle 1: Gruppengröße der Ischämie/Reperfusionsexperimente sowie der Westernblot-Untersuchungen:

CON = Kontrolle, DMSO = 10µl/g Dimethylsulfoxid, PIM-Inh. II = 10 µg/g 2-Hydroxy-3-cyano-4-phenyl-6-(3-bromo-6-hydroxyphenyl)pyridine, DES = 1,0 MAC Desfluran, DES+ PIM-Inh. II = 1,0 MAC Desfluran + 10 µg/g 2-Hydroxy-3-cyano-4-phenyl-6-(3-bromo-6-hydroxyphenyl)pyridine, IPOST = 3 Zyklen zu je 10 Sekunden Ischämie/Reperfusion, IPOST+ PIM-Inh. II = 10 µg/g 2-Hydroxy-3-cyano-4-phenyl-6-(3-bromo-6-hydroxyphenyl)pyridine + 3 Zyklen zu je 10 Sekunden Ischämie/Reperfusion.

Ergebnisse

	KG (g)	LV (mg)	LV/KG (%)	AAR (mg)	IS (mg)	IS/LV (%)	AAR/LV (%)
CON	25,4 ± 0,7	70,3 ± 2,8	0,28 ± 0,01	25,1 ± 2,6	11,4 ± 1,2	16,0 ± 1,2	35,3 ± 2,6
DMSO	26,6 ± 1,0	77,3 ± 3,1	0,29 ± 0,01	25,0 ± 2,1	11,9 ± 1,3	15,4 ± 1,6	32,5 ± 2,6
PIM-Inh.II	26,8 ± 1,4	75,9 ± 5,2	0,28 ± 0,01	23,5 ± 1,8	10,5 ± 1,7	13,7 ± 1,7	31,1 ± 1,5
DES	24,5 ± 1,2	68,7 ± 5,4	0,28 ± 0,01	21,6 ± 2,3	3,5 ± 0,7* [#]	5,1 ± 0,9* [#]	31,3 ± 1,9
DES + PIM-Inh.II	25,9 ± 1,1	76,6 ± 4,2	0,30 ± 0,01	26,7 ± 2,8	12,1 ± 1,7	16,2 ± 2,7	36,0 ± 5,1
IPOST	26,0 ± 0,4	72,9 ± 2,2	0,28 ± 0,01	21,6 ± 2,5	4,3 ± 0,5* [§]	6,0 ± 0,6* [§]	29,6 ± 3,2
IPOST + PIM-Inh.II	26,3 ± 1,1	75,6 ± 3,7	0,29 ± 0,01	23,0 ± 1,2	10,3 ± 1,4	13,5 ± 1,5	30,7 ± 1,7

Tabelle 2: Körpergewicht in g, Gewicht des linken Ventrikels in mg, Verhältnis linker Ventrikel zum Körpergewicht als Prozentwert, Gewicht der Area at Risk in mg, Gewicht der Ischämiezone in mg, Verhältnis der Ischämiezone zum linken Ventrikel als Prozentwert, Verhältnis der Area at Risk zum linken Ventrikel als Prozentwert:

Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben.

*Signifikanter Unterschied (p<0,05) zu CON, [#]Signifikanter Unterschied (p<0,05) zu DES+PIM-Inh.II,

[§]Signifikanter Unterschied (p<0,05) zu IPOST + PIM-Inh.II

KG = Körpergewicht, LV = Linker Ventrikel, AAR = Area at Risk, IS = Infarktgröße

CON = Kontrollgruppe, DMSO = Dimethylsulfoxid, DES = Desfluran, PIM-Inh.II = Pim-1 Kinase Inhibitor II, IPOST = Ischämische Postkonditionierung.

Zwischen den verschiedenen Gruppen bestand in Bezug auf Körpergewicht, Gewicht des linken Ventrikels und der AAR kein signifikanter Unterschied (siehe Tabelle 2). Auch in den Parametern der relativen Größe des linken Ventrikels zum Körpergewicht (LV/KG) sowie der relativen Größe der AAR im Verhältnis zum linken Ventrikel (AAR/LV) unterschieden sich die Gruppen nicht. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (CON) und zur DES + PIM-Inh.II - Gruppe bestanden bei dem Gewicht des Infarktareals sowie im Verhältnis der Infarktzone zur Größe des linken Ventrikels (IS/LV) in der mit Desfluran behandelten Gruppe. Des Weiteren zeigte sich bei dem Gewicht des Infarktareals sowie im Verhältnis der Infarktzone zur Größe des linken Ventrikels (IS/LV) in der IPOST-Gruppe ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe und der IPOST + PIM-Inh.II – Gruppe.

3.1 Hämodynamik

Zum Zeitpunkt der Baseline bestanden keine hämodynamischen Unterschiede in den Versuchsgruppen. Die Behandlungen zeigten zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Effekt auf die Herzfrequenz. Zu einer signifikanten Senkung des mittleren arteriellen Blutdrucks im Vergleich zur Baseline kam es während der Koronararterienokklusion in den 2 Gruppen DMSO und DES. Nach 120 Minuten Reperfusion zeigte sich in der PIM-Inh.II-Gruppe eine signifikante Reduktion des mittleren arteriellen Drucks im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Tabelle 3).

3.2 Herzinfarktgröße

In der Kontrollgruppe erreichte die Herzinfarktgröße (IS/AAR) einen Wert von $46 \pm 3\%$ (Abbildung 4). Die myokardiale Infarktgröße wurde weder alleine durch Pim-1 Kinase Inhibitor II (PIM-Inh.-II; $44\% \pm 5\%$) alleine noch durch DMSO (DMSO; $47\% \pm 3\%$) signifikant reduziert. Nach einer 18-minütigen Gabe von 1,0 MAC Desfluran während der frühen Reperfusion (DES; $16 \pm 2\%$, $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe, PIM-Inh.II und DES+PIM-Inh.II) zeigte sich eine signifikante Reduktion der myokardialen Infarktgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Blockade der Pim-1 Kinase durch Pim-1 Kinase Inhibitor II hob die Reduktion der Infarktgröße durch Desfluran komplett auf (DES+ PIM-Inh.II; $46 \pm 4\%$).

Eine Reduktion der Infarktgröße auf $21 \pm 2\%$ (IPOST; $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe, PIM-Inh.II und IPOST+ PIM-Inh.II) wurde durch die ischämische Postkonditionierung, welche durch drei 10-sekündige Zyklen von Ischämie und Reperfusion ausgelöst wurde, erreicht. Ähnlich der Gruppe, welche Desfluran erhalten hatte, wurde auch bei der IPOST-Gruppe die Infarktgrößenreduktion komplett durch die Gabe von Pim-1 Kinase Inhibitor II (IPOST+ PIM-Inh.II; $44 \pm 5\%$) aufgehoben.

Ergebnisse

	BL	PreCAO	CAO	POST	Reperfusion 60 min	Reperfusion 120 min	Reperfusion 180 min
HF (min⁻¹)							
CON	463 ± 19	462 ± 20	474 ± 21	473 ± 16	473 ± 11	455 ± 20	470 ± 10
DMSO	486 ± 17	477 ± 11	471 ± 14	483 ± 16	467 ± 11	463 ± 6	463 ± 18
PIM-Inh.II	471 ± 13	465 ± 25	458 ± 8	480 ± 19	482 ± 12	480 ± 14	489 ± 8
DES	451 ± 7	461 ± 7	457 ± 14	434 ± 5	439 ± 6	446 ± 10	460 ± 15
DES+ PIM-Inh.II	479 ± 13	466 ± 14	471 ± 10	478 ± 13	493 ± 10	484 ± 10	484 ± 8
IPOST	455 ± 12	443 ± 10	436 ± 6	447 ± 9	434 ± 24	452 ± 15	447 ± 14
IPOST+ PIM-Inh.II	467 ± 15	452 ± 15	470 ± 14	488 ± 16	445 ± 30	480 ± 16	494 ± 11
MAD (mmHg)							
CON	72 ± 3	66 ± 5	60 ± 2	70 ± 4	71 ± 4	68 ± 4	66 ± 6
DMSO	71 ± 5	70 ± 6	63 ± 5*	67 ± 7	70 ± 5	67 ± 4	64 ± 3
PIM-Inh.II	70 ± 5	67 ± 5	58 ± 6	58 ± 6	59 ± 3	54 ± 1 [§]	56 ± 3
DES	69 ± 2	68 ± 2	58 ± 3*	63 ± 4	65 ± 4	64 ± 3	68 ± 3
DES+ PIM-Inh.II	73 ± 2	68 ± 3	67 ± 2	70 ± 2	64 ± 4	64 ± 3	72 ± 6
IPOST	71 ± 5	66 ± 4	62 ± 3	67 ± 3	68 ± 4	65 ± 3	66 ± 5
IPOST+ PIM-Inh.II	74 ± 4	71 ± 4	63 ± 4	60 ± 4	66 ± 3	68 ± 4	67 ± 4

Tabelle 3: Systemische Hämodynamische Parameter:

BL = Baseline; PreCAO = vor Koronararterienokklusion; CAO = während Koronararterienokklusion; POST = während der frühen Reperfusion (Phase der Postkonditionierung); Reperfusion 60 min = 60 Minuten nach Beginn der Reperfusion; Reperfusion 120 min = 120 Minuten nach Beginn der Reperfusion; Reperfusion 180 min = 180 Minuten nach Beginn der Reperfusion; CON = Kontrollgruppe; DMSO = Dimethylsulfoxide; DES = Desfluran, PIM-Inh.II = Pim-1 Kinase Inhibitor II; IPOST = Ischämische Postkonditionierung; HF = Herzfrequenz; MAD = mittlerer arterieller Blutdruck.

*Signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich zur Baseline.

[§]Signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich zur Kontrollgruppe.

Die Daten wurden während der Baseline, vor und während der Koronarokklusion, während der frühen Reperfusion sowie 60, 120 und 180 Minuten nach Beginn der Reperfusion analysiert. Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben.

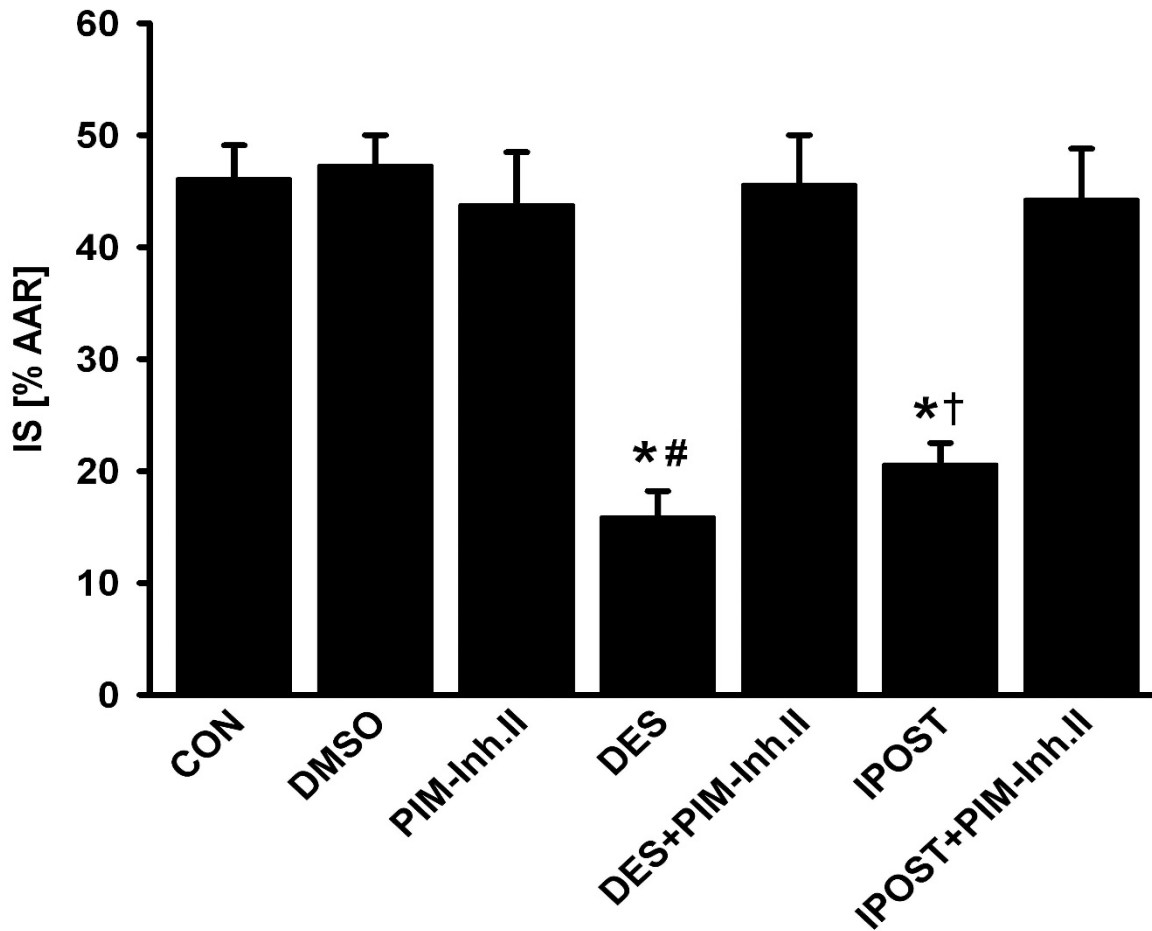


Abbildung 4: Herzinfarktgröße (IS) als Prozentwert des ischämischen Areals (AAR):

Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. n = 8 Versuchstiere pro Gruppe.

*Signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich zu CON und PIM-Inh.II.

#Signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich zu DES+ PIM-Inh.II.

†Signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich zu IPOST+ PIM-Inh.II.

Die Mäuse erhielten folgende Behandlungen: CON = keine Behandlung; DMSO = Dimethylsulfoxid; PIM-Inh.II = Pim-1 Kinase Inhibitor II; DES = Desfluran; DES+PIM-Inh.II = Desfluran in Kombination mit PIM-Inh.II; IPOST = Ischämische Postkonditionierung;

IPOST+PIM-Inh.II = Ischämische Postkonditionierung in Kombination mit PIM-Inh.II.

3.3 Proteinexpression im Westernblot

Die Proteinexpression der Pim-1 Kinase sowie des Bad-Proteins unterschied sich zwischen den Versuchsgruppen nicht und lies sich durch keines der verwendeten Pharmaka beeinflussen. (Abbildung 5 und 6A)

Ergebnisse

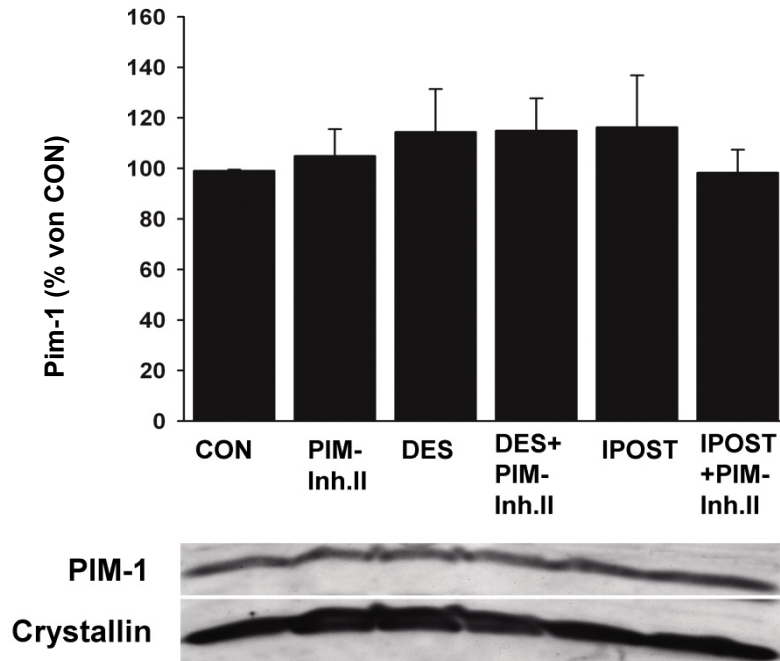


Abbildung 5: Proteinexpression der Pim-1 Kinase:

CON = Kontrollgruppe; PIM-Inh.II = Pim-1 Kinase Inhibitor II (10 μ g/g); DES = Desfluran (1,0 MAC); DES+PIM-Inh.II = Desfluran in Kombination mit PIM-Inh.II; IPOST = Ischämische Postkonditionierung (3 Zyklen einer 10sekündigen Ischämie/Reperfusion); IPOST+PIM-Inh.II = Ischämische Postkonditionierung in Kombination mit PIM-Inh.II

Die Ergebnisse sind durch einen repräsentativen Immunoblot sowie als Durchschnittswert der densitometrischen Ergebnisse in Prozent im Bezug auf die Kontrollgruppe dargestellt.

n = 4 Versuchstiere pro Gruppe.

Die Desfluran-induzierte Phosphorylierung von Bad an Serin112 wurde durch Pim-1 Kinase Inhibitor II signifikant reduziert. Die durch IPOST induzierte Phosphorylierung von Bad an Serin 112 wurde hingegen durch Pim-1 Kinase Inhibitor II nicht beeinflusst (Abbildung 6B).

Ergebnisse

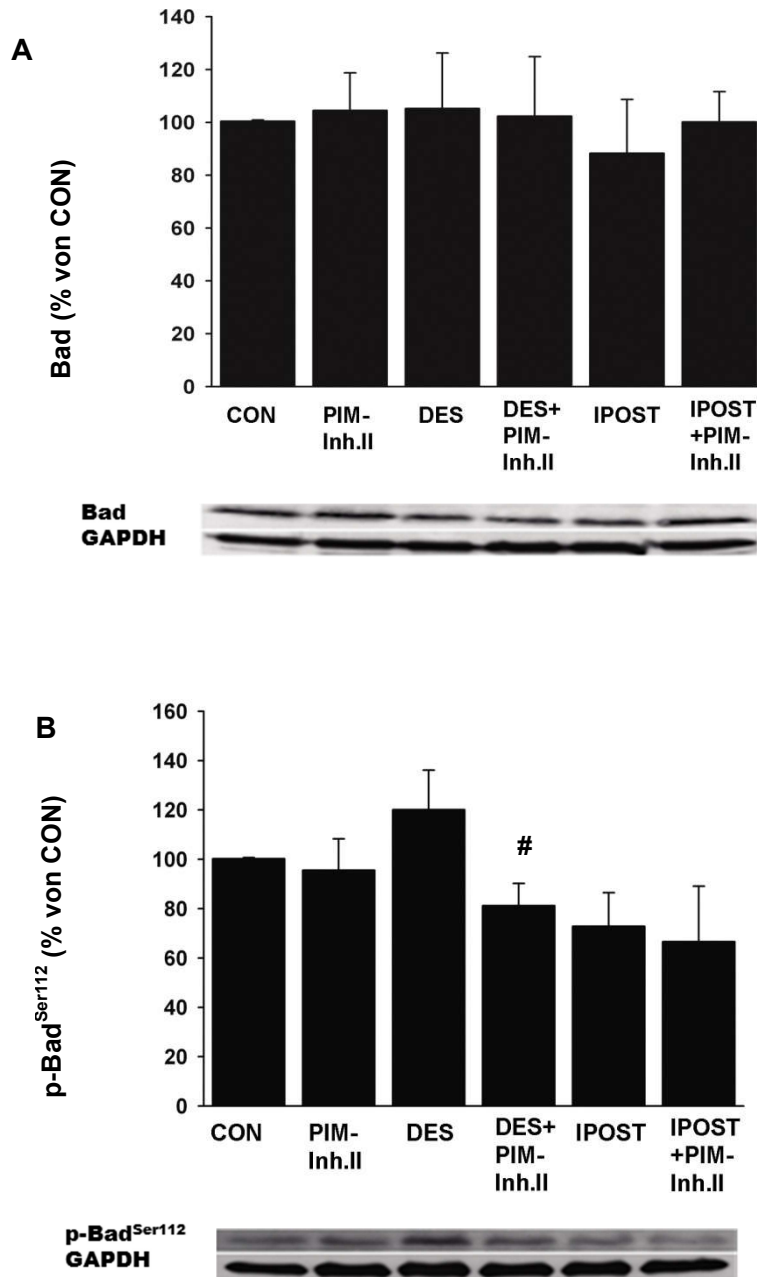


Abbildung 6: Myokardiale Proteinexpression des Bad- (A) sowie des phospho-Bad^{Ser112}-Proteins (B): CON = Kontrollgruppe; PIM-Inh.II = Pim-1 Kinase Inhibitor II (10µg/g); DES = Desfluran (1,0 MAC); DES+ PIM-Inh.II = Desfluran in Kombination mit PIM-Inh.II; IPOST = Ischämische Postkonditionierung (3 Zyklen einer 10sekündigen Ischämie/Reperfusion); IPOST+ PIM-Inh.II = Ischämische Postkonditionierung in Kombination mit PIM-Inh.II

#Signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich zu DES

Die Ergebnisse sind durch einen repräsentativen Immunoblot sowie als Durchschnittswert der densitometrischen Ergebnisse in Prozent im Bezug auf die Kontrollgruppe dargestellt.

n = 4 Versuchstiere pro Gruppe.

Ergebnisse

Die Expression von Bcl-2 wurde durch keine der unterschiedlichen Behandlungen beeinflusst (Abbildung 7).

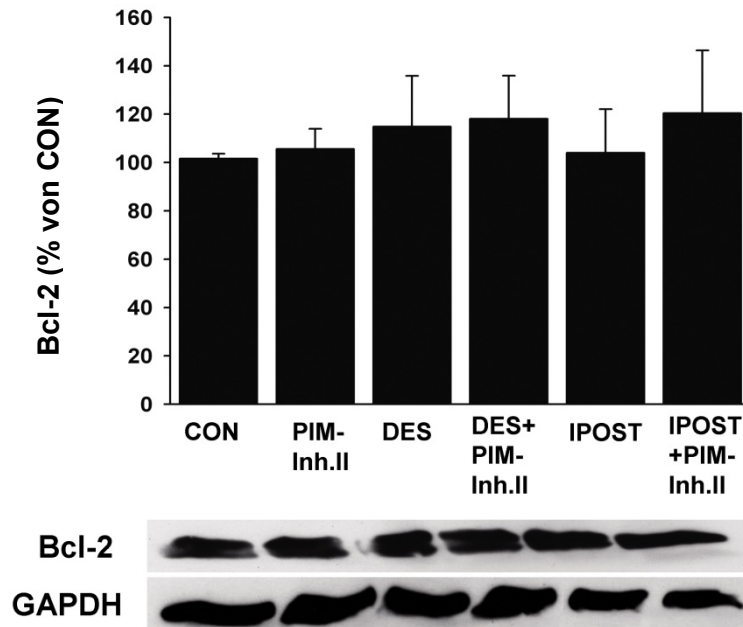


Abbildung 7: Immunoblot der Bcl-2-Expression:

CON = Kontrollgruppe; PIM-Inh.II = Pim-1 Kinase Inhibitor II (10 μ g/g); DES = Desfluran (1,0 MAC); DES+ PIM-Inh.II = Desfluran in Kombination mit PIM-Inh.II; IPOST = Ischämische Postkonditionierung (3 Zyklen einer 10sekündigen Ischämie/Reperfusion); IPOST+PIM-Inh.II = Ischämische Postkonditionierung in Kombination mit PIM-Inh.II

Die Ergebnisse sind durch einen repräsentativen Immunoblot sowie als Durchschnittswert der densitometrischen Ergebnisse in Prozent im Bezug auf die Kontrollgruppe dargestellt.

n = 4 Versuchstiere pro Gruppe.

4 Diskussion

Unter dem Phänomen der Postkonditionierung versteht man einen intrinsischen Schutzmechanismus myokardialer Zellen gegen die deletären Folgen einer myokardialen Ischämie. Die Postkonditionierung kann sowohl durch kurze Zyklen von Ischämie/Reperfusion als auch durch verschiedene Pharmaka, unter anderem volatile Anästhetika, induziert werden. In der vorliegenden Studie kamen Ischämie/Reperfusion-Zyklen sowie volatile Anästhetika zum Einsatz.

Ziel der Studie war es nachzuweisen, dass die Pim-1 Kinase an der Vermittlung der ischämischen und der Desfluran-induzierten Postkonditionierung beteiligt ist. Des Weiteren sollte gezeigt werden, dass die Pim-1 Kinase antiapoptotische Signalmechanismen beeinflusst. Für die Experimente wurde das akute Myokardinfarktmodell an männlichen C57BL/6 Mäusen verwendet, um die Effekte der Pim-1 Kinase bei der ischämischen und Desfluran-induzierten Postkonditionierung des Myokards zu untersuchen. Des Weiteren wurde mittels Western-Immunoblotting die Expression der Pim-1 Kinase, von Bad, Bcl-2 sowie an Serin¹¹² phosphoryliertem Bad untersucht. Die Bestimmung von phospho-BadSer¹¹² diente hierbei als Surrogatparameter der Aktivität der Pim-1 Kinase.

Sowohl die Desfluran-induzierte als auch die ischämische Postkonditionierung induzierten kardioprotektive Effekte im akuten in-vivo Herzinfarkt-Modell der Maus. Sowohl nach 18-minütiger Applikation von 1,0 MAC Desfluran (APOST) während der frühen Reperfusion als auch nach 3 Zyklen von jeweils 10 Sekunden Ischämie/Reperfusion (IPOST) unmittelbar nach der stattgehabten Myokardischämie fand sich eine deutliche Reduktion der Größe des Myokardinfarkts. Hinsichtlich der Infarktgrößenreduktion stimmen unsere Ergebnisse mit vorhergehenden Studien sowohl unserer als auch anderer Arbeitsgruppen zu APOST^[32, 38, 76] und IPOST^[32-34, 76] überein. So wurde durch den Einsatz von APOST eine Reduktion der Infarktgröße um bis zu 36%^[32] im Vergleich zur Kontrollgruppe erreicht. In vorausgegangen Studien zur

IPOST konnten die Infarktgrößen um bis zu 30,8%^[32] gegenüber der Kontrollgruppe gesenkt werden. In unserer Studie senkten Desfluran (30%) und IPOST (25%) die Infarktgröße ungefähr gleich stark. Unsere Ergebnisse bestätigen die Resultate anderer Studien an Kaninchen^[76] und Mäusen^[32, 33]. APOST und IPOST stellen viel versprechende Strategien zur Reduktion des kardialen Ischämie/Reperfusionsschadens dar. Neben dem Modell der Maus existieren auch Hunde-^[27], Schweine-^[28], Kaninchen-^[29] und Rattenmodelle^[9, 30, 31] zur Untersuchung der Postkonditionierung. Jedoch wird auch innerhalb derselben Spezies so gut wie nie die gleiche Häufigkeit und Länge der Ischämie/Reperfuzyklen angewandt. Vergleicht man die vorliegende Studie in der 3 Zyklen einer 10s Ischämie und einer 10s Reperfusion eingesetzt wurden mit der Studie von Tsutsumi et al.^[33] oder der Studie von Redel et al.^[32] so stellt man fest, dass jeweils 3 Zyklen mit jedoch unterschiedlicher Länge (20s^[33], 30s^[32]) eingesetzt wurden, sich daraus jedoch keine wesentliche Veränderung in der Wirksamkeit der Postkonditionierung ergab. Zwischen den unterschiedlichen Spezies scheint dies jedoch relevant. So findet man Zyklushäufigkeiten von 3-6 Zyklen und Ischämie/Reperfuzyklenzeiten von 10s (Maus^[32, 33], Ratte^[9, 30, 31]) über 30 s (Hund^[27], Schwein^[28]) bis hin zu 1 Minute (Kaninchen^[29]).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sowohl die Desfluran-induzierte als auch die ischämische Postkonditionierung durch pharmakologische Inhibition der Pim-1 Kinase mittels des selektiven^[71] Pim-1 Kinase Inhibitor II komplett aufgehoben wurden. In einer vorhergehenden in vivo-Studie unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine Dosis von 10µg/g KG die Pim-1 Kinase Aktivität in Mäusen signifikant inhibiert^[14]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Serin/Threoninkinase Pim-1 in der Signaltransduktionskaskade der APOST und IPOST eine wichtige Rolle spielt. Vergleicht man die Ergebnisse der Tiere, welche eine Kombination aus Desfluran und Pim-1 Kinase Inhibitor II erhielten, mit den Ergebnissen der Studie unserer Arbeitsgruppe zur Präkonditionierung^[14] so stellt man fest, dass in beiden Studien der jeweilige Schutzmechanismus der Desfluran-induzierten Prä- oder Postkonditionierung durch die Blockade der Pim-1 Kinase komplett aufgehoben wird. Dies weist darauf hin, dass Desfluran-induzierte Präkonditionierung

und Desfluran-induzierte Postkonditionierung über sehr ähnliche Signaltransduktionswege vermittelt werden. Vergleicht man im Gegensatz dazu die Ergebnisse der Tiere dieser Studie, die mit IPOST behandelt wurden, mit den Ergebnissen der Tiere der vorausgegangenen Studie, welche IPC erhielten, so stellt man fest, dass die ischämische Präkonditionierung durch pharmakologische Blockade der Pim-1 Kinase nur teilweise aufgehoben wird^[14], während die ischämische Postkonditionierung durch die Blockade der Pim-1 Kinase komplett aufgehoben wird. Möglicherweise könnte dies darauf hinweisen, dass die Pim-1 Kinase in den Signalkaskaden der IPC und der IPOST einen unterschiedlichen Stellenwert hat. Um dies abschließend beurteilen zu können bedarf es jedoch weiterer Studien, welche die möglichen Unterschiede zwischen den beiden Signalkaskaden untersuchen.

Die Pim-1 Kinase spielt jedoch nicht nur eine wichtige Rolle in der Signalkaskade der IPC und der IPOST sondern hat auch eine wichtige Bedeutung in der Regulation des Zellzyklus, der Proliferation und beim Überleben der Zelle^[44, 77]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Serin/Threoninkinase Pim-1 mit ihren unterschiedlichen Wirkungen am Schutz des Herzens nach einem Myokardinfarkt beteiligt ist. Eine wichtige Rolle, welche Pim-1 als Zielprotein von Akt zugeschrieben wird, ist die Regulation des Überlebens der Kardiomyozyten^[11]. Für Akt selbst ist bekannt, dass es Teil des RISK-Signaltransduktionswegs ist^[43] und sowohl ischämische^[9] als auch Anästhetika-induzierte^[10] Postkonditionierung vermittelt. Die entscheidende Bedeutung der Pim-1 Kinase im Rahmen der Kardioprotektion^[11] wurde 2007 durch Muraski et al. erstmals beschrieben. Die Arbeitsgruppe legte in einer in vitro Untersuchung an neonatalen Rattenkardiomyozyten dar, dass kardioprotektive Faktoren wie zum Beispiel „LIF, PMA, Dexamethason oder IGF-1“ zur Expression von Pim-1 Kinase führen können. Genetisch veränderte neonatale Rattenkardiomyozyten (NRCM), welche für Akt dominant negativ waren, verminderten den Anstieg von Pim-1 nach Behandlung mit kardioprotektiven Faktoren. Überexpression von Akt führte jedoch zu einer verstärkten Expression der Pim-1 Kinase. Zusätzlich konnten Muraski et al.^[11] zeigen, dass durch die Überexpression von Pim-1 Kinase in NRCM nachfolgend auch die Proteine Bcl-XL, Bcl-2 vermehrt nachweisbar waren und dass die Phosphorylierung

von Bad an Serin 112 gesteigert wurde. Des Weiteren zeigte die Studie, dass Pim-1 Knockout-Mäuse größere Herzinfarkte entwickelten während transgene Tiere, welche Pim-1 überexprimierten, eine geringere Herzinfarktgröße aufwiesen^[11]. Außerdem zeigte die Arbeitsgruppe um Muraski in einer weiteren Studie, dass eine Überexpression von Pim-1 vor dem Remodeling nach einer Konstriktion der Aorta und der dadurch induzierten linksventrikulären Hypertrophie schützt^[12].

Weitere Hinweise darauf, dass die Pim-1 Kinase kardioprotektive Eigenschaften besitzt, lieferten Cottage et al.^[60] und Fischer et al.^[13] mit ihren Studien an kardialen Stammzellen. Dabei wurden kardiale Stammzellen, welche Pim-1 überexprimierten, weiblichen Mäusen intramyokardial injiziert. Sowohl in vivo als auch in vitro steigerte dies die Proliferation der Stammzellen^[13, 60], führte zu einer besseren Funktion des Ventrikels und reduzierte die Größe des Myokardinfarkts^[13]. Bei Pim-1 Knockout Mäusen hingegen erhöhte sich nach stattgehabtem Myokardinfarkt sowie nach Konstriktion der Aorta die Rate an apoptotischem Zelltod und die Kontraktilität des Ventrikels war beeinträchtigt^[11, 12]. Weiterhin zeigte sich in Pim-1 Knockout Mäusen, dass sich in Kardiomyozyten der Gehalt an Pim-2 erhöhte. Pim-2 vermochte bei einem Myokardinfarkt jedoch nicht den gleichen Schutz wie Pim-1 zu bieten^[11]. Liu et al. führten 2009 ein in vitro Experiment an Kardiomyozyten durch. In dieser Studie wurden die Zellen einer Anoxie mit glukosefreier Tyrode-Lösung für 3 Stunden und anschließend einer 2-stündigen Reoxygenierung ausgesetzt. Dabei wurde entdeckt, dass die zur Pim-1 Kinase strukturell ähnliche und in der Sequenz homologe Pim-3 Kinase in neonatalen Rattenkardiomyozyten nach Anoxie und folgender Reoxygenierung Kardiomyozyten vor Apoptose schützt^[78]. Auch die Ca²⁺-ATPase des sarkoplasmatischen/endoplasmatischen Retikulums (SERCA) könnte bei der Kardioprotektion durch die Pim-1 Kinase eine Rolle spielen, da die Pim-1 Kinase die Expression der Ca²⁺-ATPase erhöht^[11]. Die Ca²⁺-ATPase transportiert Calcium vom Zytosol ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums, dies könnte die Kardiomyozyten vor einer Calciumüberladung während der myokardialen Reperfusion schützen. Die Expression und Aktivität der Pim-1 Kinase scheinen daher wichtig für die Kardioprotektion zu sein.

In den verschiedenen Versuchsgruppen der vorliegenden Studie bestanden bezüglich der Expression von Pim-1 Kinase in den Ganzzelllysaten keine Unterschiede, welche sich auf die Ergebnisse der Studie hätten auswirken können. In einer vorangegangenen Studie, welche die Effekte der Pim-1 Kinase bei der ischämischen und der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung untersuchte, wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet^[14]. Penna und Kollegen untersuchten an einem Rattenmodell die Wirkung von ischämischer Postkonditionierung auf Mitochondrien. In der Untersuchung zeigte sich, dass in Rattenherzen die Expression von Pim-1 Kinase in der zytosolischen Fraktion in Folge von Ischämie/Reperfusion vermindert wurde. IPOST konnte das Ausmaß dieser Reduktion vermindern. Die Autoren interpretieren dies als intrazelluläre Umverteilung der Pim-1 Kinase^[79]. Da zwischen der vorliegenden und Pennas Studie^[79] jedoch einige Unterschiede bestehen, sind die beiden Studien nicht direkt vergleichbar. Die Unterschiede der beiden Studien bestehen in:

- den unterschiedlichen Zellfraktionen, die analysiert wurden (Penna: Zytosolische Fraktion; vorliegende Studie: Ganzzelllysate).
- unterschiedlichen Modellen der Experimente (Penna: Isolierte Rattenherzen; vorliegende Studie: in vivo Modell der Maus).
- einem unterschiedlichen experimentellen Protokoll der Ischämie/Reperfusionbehandlung (Penna: 30 Minuten globale Ischämie gefolgt von 120 Minuten Reperfusion; vorliegende Studie: 45-minütiger Verschluss der linken Koronararterie gefolgt von einer 60-minütigen Reperfusion bis zur Entnahme des Myokardgewebes).
- einem unterschiedlichen Postkonditionierungsprotokoll (Penna: Einsatz von 5 Zyklen einer 10-sekündigen Reperfusion/Ischämie; vorliegende Studie: 3 Zyklen einer 10-sekündigen Reperfusion/Ischämie).

Borillo et. al^[59] konnten zeigen, dass Pim-1 in Kardiomyozyten von Mäusen nach einem Ischämie/Reperfusion-Schaden aus dem Zytosol in die Mitochondrien transloziert. In dieser Untersuchung wurde die Konzentration der Pim-1 Kinase im Mitochondrium und im Zytosol gemessen. Eine 30-minütige Ischämie gefolgt von einer 30-minütigen Reperfusion führte zu einem Anstieg von Pim-1 im Mitochondrium. Damit

übereinstimmend sank nach einer 30-minütigen Ischämie gefolgt von einer 10-minütigen Reperfusion die Konzentration der Pim-1 Kinase im Zytosol ab^[59].

Aho et. al. zeigten 2004, dass die Pim-1 Kinase das Protein Bad, welches proapoptotisch wirkt, an Serin¹¹² spezifisch phosphoryliert^[45]. Eine Phosphorylierung des Proteins Bad führt zu seiner Inaktivierung^[45]. Die Autoren zogen daher den Schluss, dass der Pim-1 Kinase eine Rolle beim Schutz vor Zelltod zugeschrieben werden kann, da inaktiviertes Bad die Aktivität von Bcl-2 steigerte. Bcl-2 seinerseits fördert das Überleben von Zellen^[45]. In transgenen Mäusen, welche Pim-1 Kinase überexprimierten, wurde gezeigt, dass auch die Proteine Bcl-XL und Bcl-2 vermehrt nachweisbar waren und dass Kardiomyozyten vor Apoptose geschützt wurden^[11]. In den unterschiedlich behandelten Gruppen gab es keine Unterschiede in der Expression der Pim-1 Kinase. Die Unterschiede in der Expression von phospho-Bad^{Ser112} können daher am ehesten auf einen Unterschied in der Aktivität der Pim-1 Kinase zurückgeführt werden. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie deuten auf anti-apoptotische Effekte volatiler Anästhetika beim kardialen Ischämie-/Reperfusionsschaden hin: Die Desfluran-induzierte Phosphorylierung von Bad an Serin¹¹² wurde durch die Blockade mit Pim-1 Kinase Inhibitor II signifikant reduziert. Im Gegensatz dazu scheint die Ischämische Postkonditionierung die Phosphorylierung von Bad an Serin¹¹² zu senken, auch wenn die vorliegende Studie hinsichtlich dessen keine statistisch signifikanten Ergebnisse zeigte. Dies könnte unter anderem an einer zu kurzen Dauer der Reperusionsphase liegen. Eine Behandlung mit Pim-1 Kinase Inhibitor II alleine beeinflusste die Phosphorylierung des Proteins Bad an Serin¹¹² nicht. Es werden daher weitere Studien benötigt, um herauszufinden, ob eine Phosphorylierung von Bad an Serin¹¹² durch die Pim-1 Kinase notwendig ist, um das Myokard mit Hilfe von IPOST zu schützen.

Ein weiteres Schlüsselprotein ist das B-cell Lymphom-2 Protein (Bcl-2), welches auf der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist^[80] und die apoptotische Kaskade reguliert. Die Bcl-2-Aktivität wird durch inaktives phospho-Bad^{Ser112} gesteigert^[45]. Eine Aktivierung von Bcl-2 verhindert die Freisetzung von Cytochrom C vom Mitochondrium (intermembrane space) ins Zytosol^[46]. Es ist bekannt, dass dies einer

der ersten Schritte ist, welcher die apoptotische Signalkaskade anstößt^[48]. In transgenen Tieren, welche Bcl-2 in Kardiomyozyten überexprimierten, wurde weniger Nekrose und Apoptose nach einer Ischämie festgestellt^[81]. Borillo et al. zeigten, dass bei Mäusen, bei welchen Bcl-2 mittels RNA-Interferenz (si-RNA) ausgeschaltet wurde, die Apoptoserate nach Applikation von Staurosporin signifikant anstieg^[59]. Des Weiteren wurde festgestellt, dass Bcl-2 die Öffnung der mPTP beeinflusst^[82]. Öffnet sich die mPTP so führt dies zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotenzials, einer Entkopplung der Atmungskette und der Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium ins Zytosol und konsekutivem Auslösen von Apoptose oder Nekrose^[83]. Daher spielt die mPTP eine wichtige Rolle sowohl bei APOST^[25, 84] als auch bei der IPOST^[41]. Es wurde gezeigt, dass in Kaninchen sowohl ischämische als auch Isofluran-induzierte Postkonditionierung durch Bcl-2 vermittelt wird^[76]. Eine pharmakologische Inhibition von Bcl-2 mittels HA14-1 verhinderte die Infarktgrößenreduktion sowohl durch Zyklen von Ischämie und Reperfusion als auch durch die Gabe von Isofluran während der frühen Reperfusion^[76]. Jamnicki-Abegg et al. zeigten, dass die Gabe von Isofluran zur Aktivierung von Akt und zu einer erhöhten Expression von Bcl-2 führte und so Kardiomyozyten vor der Apoptose schützt^[85]. Bcl-2 spielt auch bei der ischämischen Präkonditionierung eine Rolle und wird in isolierten Rattenherzen durch IPC induziert^[86]. Für die alleinige Behandlung mit Ischämie/Reperfusion wurde gezeigt, dass es sowohl in der zytosolischen als auch in der mitochondrialen Fraktion zu einer Reduktion der Bcl-2-Konzentration kommt, während bei einer Behandlung mit IPOST die Bcl-2-Reduktion weniger ausgeprägt war. Des Weiteren bewirkte IPOST eine Umverteilung von Bcl-2 zwischen Mitochondrium und Zytosol^[79]. In der vorliegenden Studie konnten keine Unterschiede in der Bcl-2 Expression in den unterschiedlichen Versuchsgruppen festgestellt werden. Die Unterschiede zur Studie von Penna et al.^[79] können folgendermaßen erklärt werden: In den Studien wurden verschiedene experimentelle Bedingungen eingesetzt. Während in der vorliegenden Studie die Herzen für die Analyse des Westernblots bereits nach einer Stunde Reperfusion entnommen wurden, wurden die Herzen in der Studie von Penna et al. erst nach zwei Stunden Reperfusion entnommen^[79]. Dieser Zeitunterschied könnte für die Unterschiede in der gemessenen Expression von Bcl-2 verantwortlich sein und wahrscheinlich ist das

Zeitfenster der vorliegenden Studie von einer Stunde Reperfusion zu kurz, um Unterschiede in der Ausprägung von Bcl-2 im Westernblot messen zu können.

Bei der Interpretation der vorliegenden Studie gilt es jedoch potentiell limitierende Faktoren zu berücksichtigen. Pim-1 Kinase Inhibitor II zeigte eine größere Selektivität für Pim-1 Kinase verglichen mit Pim-2 Kinase^[71]. Pim-1 Kinase Inhibitor II zeigt für die Pim-1 Kinase eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von 50nM während die IC_{50} für Pim-2 Kinase bei $>20\mu M$ liegt^[71]. Dennoch können Wirkungen und Interaktionen des Pim-1 Kinase Inhibitors II auf Pim-2 und Pim-3 Kinase sowie auf andere Kinasen, die an der Signaltransduktionskette der IPOST oder der APOST beteiligt sind, nicht vollständig ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Studie wurde die Pim-1 Kinase Aktivität nicht direkt gemessen, sondern die Phosphorylierung von Bad an Serin¹¹² als Surrogatparameter für die Aktivität der Pim-1 Kinase benutzt. Zuvor war gezeigt worden, dass Pim-1 Kinase das Protein Bad spezifisch an Serin¹¹² phosphoryliert^[45]. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass andere Kinasen wie zum Beispiel Akt, welche eine Rolle in der Kaskade der Postkonditionierung spielen, Bad auch an Serin¹¹² phosphorylieren. Für Akt wurde jedoch berichtet, dass es das Protein Bad hauptsächlich an Serin¹³⁶ phosphoryliert^[87]. Für die hier durchgeführte Studie wurden 10 – 12 Wochen alte gesunde männliche C57BL/6 Mäuse verwendet. Verschiedene Studien zeigen jedoch, dass zum Beispiel ein Diabetes mellitus^[88], eine Hyperglykämie^[88] sowie auch das Geschlecht^[89] Einfluss auf die Postkonditionierung nehmen. Drenger et. al. zeigten in ihrer Studie, dass bei Ratten, welche an einem Diabetes mellitus oder einer Hyperglykämie litten, die Postkonditionierung blockiert wurde. Auch nach einer Verabreichung von Insulin an die Ratten mit Diabetes mellitus oder Hyperglykämie war kein postkonditionierender Effekt nachzuweisen^[88].

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass sowohl die Desfluran-induzierte als auch die ischämische Postkonditionierung nach stattgehabter Myokardischämie durch die Pim-1 Kinase vermittelt werden. Die anti-apoptischen Effekte der Desfluran-induzierten Postkonditionierung werden durch die Pim-1 Kinase vermittelt. Die Modulation anti-apoptischer Proteine könnte somit einen möglichen Ansatz zur Behandlung des myokardialen Ischämie/Reperfusionsschadens darstellen. Weitere

Diskussion

Studien müssen jedoch durchgeführt werden, um die genauen intrazellulären Effekte der Pim-1 Kinase im Kontext der APOST und IPOST zu verstehen.

5 Zusammenfassung

Postkonditionierung ist ein Schutzmechanismus der Zelle, welcher durch repetitive Zyklen von Ischämie und Reperfusion oder durch Applikation von volatilen Anästhetika nach stattgehabter Myokardischämie induziert werden kann. Ischämische Postkonditionierung (IPOST) und Anästhetika-induzierte Postkonditionierung (APOST) können den Ischämie/Reperfusionsschaden am Myokard reduzieren. Die Untersuchung der zugrunde liegenden intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen ist hierbei von besonderem Interesse für eine potenzielle therapeutische Einsetzbarkeit. Bei der Pim-1 Kinase handelt es sich um ein Protein mit anti-apoptotischen Eigenschaften, dessen Bedeutung im Kontext der Postkonditionierung bislang nicht untersucht wurde.

Ziel der Arbeit war es die Effekte der Pim-1 Kinase bei ischämischer und Desfluran-induzierter Postkonditionierung des Myokards sowie den Einfluss einer pharmakologischen Pim-1 Blockade auf IPOST und APOST zu untersuchen. Dazu wurde Desfluran alleine oder in Kombination mit dem selektiven Pim-1 Kinase Inhibitor II 5 Minuten vor Ende der Koronarokklusion verabreicht. Des Weiteren wurde in anderen Gruppen 3 Zyklen Ischämie/Reperfusion alleine oder kombiniert mit Pim-1 Kinase Inhibitor II eingesetzt. Sowohl Desfluran als auch drei je 10-sekündige Zyklen Ischämie/Reperfusion führten zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion gegenüber Kontrollbedingungen. Dieser Effekt wurde sowohl in der Gruppe der Desfluran behandelten Tiere als auch in der Gruppe, welche mit drei je 10-sekündigen Zyklen Ischämie/Reperfusion behandelt worden war, durch den Einsatz von Pim-1 Kinase Inhibitor II komplett aufgehoben. Des Weiteren zeigten die Ergebnisse der Westernblot-Analyse, dass die pharmakologische Blockade der Pim-1 Kinase die Desfluran-induzierte Phosphorylierung von Bad an Serin112 signifikant reduzierte.

Diese Resultate weisen darauf hin, dass sowohl die ischämische als auch die Desfluran-induzierte Postkonditionierung im Mausmodell durch die Serin/Threonin Kinase Pim-1 vermittelt werden und dass die Desfluran-induzierte Postkonditionierung anti-apoptotische Effekte induzieren kann, welche zumindest teilweise über die Aktivität der Pim-1 Kinase reguliert werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt, D., *Todesursachen: Sterbefälle insgesamt 2014 nach den 10 häufigsten Todesursachen der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10)*. 2014.
2. WHO, *Global Health Risks: Mortality and burden of disease attributable to selected major risks*. 2009.
3. Braunwald, E., *Effects of digitalis on the normal and the failing heart*. J Am Coll Cardiol, 1985. **5**(5 Suppl A): p. 51A-59A.
4. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
5. Manning, A.S. and D.J. Hearse, *Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention*. J Mol Cell Cardiol, 1984. **16**(6): p. 497-518.
6. Bolli, R. and E. Marban, *Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning*. Physiol Rev, 1999. **79**(2): p. 609-34.
7. Ito, H., *No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2006. **3**(9): p. 499-506.
8. Chiari, P.C., et al., *Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits*. Anesthesiology, 2005. **102**(1): p. 102-9.
9. Tsang, A., et al., *Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway*. Circ Res, 2004. **95**(3): p. 230-2.
10. Li, H., et al., *Sevoflurane post-conditioning protects against myocardial reperfusion injury by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2008. **35**(9): p. 1043-51.
11. Muraski, J.A., et al., *Pim-1 regulates cardiomyocyte survival downstream of Akt*. Nat Med, 2007. **13**(12): p. 1467-75.
12. Muraski, J.A., et al., *Pim-1 kinase antagonizes aspects of myocardial hypertrophy and compensation to pathological pressure overload*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(37): p. 13889-94.
13. Fischer, K.M., et al., *Enhancement of myocardial regeneration through genetic engineering of cardiac progenitor cells expressing Pim-1 kinase*. Circulation, 2009. **120**(21): p. 2077-87.
14. Stumpner, J., et al., *Differential role of Pim-1 kinase in anesthetic-induced and ischemic preconditioning against myocardial infarction*. Anesthesiology, 2009. **111**(6): p. 1257-64.
15. Kin, H., et al., *Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion*. Cardiovasc Res, 2004. **62**(1): p. 74-85.
16. Yang, X.M., et al., *NECA and bradykinin at reperfusion reduce infarction in rabbit hearts by signaling through PI3K, ERK, and NO*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **36**(3): p. 411-21.
17. Jonassen, A.K., et al., *Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling*. Circ Res, 2001. **89**(12): p. 1191-8.

Literaturverzeichnis

18. Bell, R.M. and D.M. Yellon, *Atorvastatin, administered at the onset of reperfusion, and independent of lipid lowering, protects the myocardium by up-regulating a pro-survival pathway*. J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(3): p. 508-15.
19. Gross, E.R., A.K. Hsu, and G.J. Gross, *Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts*. Circ Res, 2004. **94**(7): p. 960-6.
20. Duan, X., et al., *Pharmacological postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury: the role of mitochondrial permeability transition pore*. ASAIO J, 2011. **57**(3): p. 197-202.
21. Weihrauch, D., et al., *Morphine enhances isoflurane-induced postconditioning against myocardial infarction: the role of phosphatidylinositol-3-kinase and opioid receptors in rabbits*. Anesth Analg, 2005. **101**(4): p. 942-9, table of contents.
22. Krolkowski, J.G., et al., *Inhibition of mitochondrial permeability transition enhances isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion: the role of mitochondrial KATP channels*. Anesth Analg, 2005. **101**(6): p. 1590-6.
23. Siegmund, B., et al., *Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture*. Circulation, 1997. **96**(12): p. 4372-9.
24. Krolkowski, J.G., et al., *Role of Erk1/2, p70s6K, and eNOS in isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion in vivo*. Can J Anaesth, 2006. **53**(2): p. 174-82.
25. Feng, J., et al., *Isoflurane postconditioning prevents opening of the mitochondrial permeability transition pore through inhibition of glycogen synthase kinase 3beta*. Anesthesiology, 2005. **103**(5): p. 987-95.
26. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
27. Zhao, Z.Q., et al., *Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(2): p. H579-88.
28. Iliodromitis, E.K., et al., *Protection from post-conditioning depends on the number of short ischemic insults in anesthetized pigs*. Basic Res Cardiol, 2006. **101**(6): p. 502-7.
29. Argaud, L., et al., *Increased mitochondrial calcium coexists with decreased reperfusion injury in postconditioned (but not preconditioned) hearts*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(1): p. H386-91.
30. Kin, H., et al., *Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine*. Cardiovasc Res, 2005. **67**(1): p. 124-33.
31. Penna, C., et al., *Post-conditioning reduces infarct size in the isolated rat heart: role of coronary flow and pressure and the nitric oxide/cGMP pathway*. Basic Res Cardiol, 2006. **101**(2): p. 168-79.
32. Redel, A., et al., *Comparison of isoflurane-, sevoflurane-, and desflurane-induced pre- and postconditioning against myocardial infarction in mice in vivo*. Exp Biol Med (Maywood), 2009. **234**(10): p. 1186-91.
33. Tsutsumi, Y.M., et al., *Reactive oxygen species trigger ischemic and pharmacological postconditioning: in vivo and in vitro characterization*. Life Sci, 2007. **81**(15): p. 1223-7.
34. Boengler, K., et al., *Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice*. Circ Res, 2008. **102**(1): p. 131-5.
35. Staat, P., et al., *Postconditioning the human heart*. Circulation, 2005. **112**(14): p. 2143-8.
36. Vinten-Johansen, J., et al., *Postconditioning--A new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury*. Basic Res Cardiol, 2005. **100**(4): p. 295-310.
37. Schlack, W., et al., *Halothane reduces reperfusion injury after regional ischaemia in the rabbit heart in vivo*. Br J Anaesth, 1997. **79**(1): p. 88-96.

Literaturverzeichnis

38. Lange, M., et al., *Desflurane-induced postconditioning is mediated by beta-adrenergic signaling: role of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors, protein kinase A, and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*. *Anesthesiology*, 2009. **110**(3): p. 516-28.
39. Deyhimy, D.I., et al., *Anesthetic preconditioning combined with postconditioning offers no additional benefit over preconditioning or postconditioning alone*. *Anesth Analg*, 2007. **105**(2): p. 316-24.
40. Lemoine, S., et al., *Signaling pathways involved in desflurane-induced postconditioning in human atrial myocardium in vitro*. *Anesthesiology*, 2008. **109**(6): p. 1036-44.
41. Argaud, L., et al., *Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition*. *Circulation*, 2005. **111**(2): p. 194-7.
42. Hausenloy, D.J., A. Tsang, and D.M. Yellon, *The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning*. *Trends Cardiovasc Med*, 2005. **15**(2): p. 69-75.
43. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection*. *Heart Fail Rev*, 2007. **12**(3-4): p. 217-34.
44. Bachmann, M. and T. Moroy, *The serine/threonine kinase Pim-1*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005. **37**(4): p. 726-30.
45. Aho, T.L., et al., *Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site*. *FEBS Lett*, 2004. **571**(1-3): p. 43-9.
46. Kluck, R.M., et al., *The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis*. *Science*, 1997. **275**(5303): p. 1132-6.
47. Goldstein, J.C., et al., *The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(3): p. 156-62.
48. Bossy-Wetzel, E., D.D. Newmeyer, and D.R. Green, *Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization*. *EMBO J*, 1998. **17**(1): p. 37-49.
49. Heusch, G. and R. Schulz, *[Ischemic pre- and postconditioning]*. *Dtsch Med Wochenschr*, 2006. **131**(39): p. 2169-75.
50. Dreyfus, F., et al., *Rearrangements of the Pim-1, c-myc, and p53 genes in Friend helper virus-induced mouse erythroleukemias*. *Leukemia*, 1990. **4**(8): p. 590-4.
51. Cuypers, H.T., et al., *Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis: integration of proviruses in a distinct chromosomal region*. *Cell*, 1984. **37**(1): p. 141-50.
52. Saris, C.J., J. Domen, and A. Berns, *The pim-1 oncogene encodes two related protein-serine/threonine kinases by alternative initiation at AUG and CUG*. *EMBO J*, 1991. **10**(3): p. 655-64.
53. Mikkers, H., et al., *Mice deficient for all PIM kinases display reduced body size and impaired responses to hematopoietic growth factors*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(13): p. 6104-15.
54. Padma, R. and L. Nagarajan, *The human PIM-1 gene product is a protein serine kinase*. *Cancer Res*, 1991. **51**(9): p. 2486-9.
55. Palaty, C.K., et al., *Identification of the autophosphorylation sites of the Xenopus laevis Pim-1 proto-oncogene-encoded protein kinase*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(16): p. 10514-21.
56. Qian, K.C., et al., *Structural basis of constitutive activity and a unique nucleotide binding mode of human Pim-1 kinase*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(7): p. 6130-7.
57. Eichmann, A., et al., *Developmental expression of pim kinases suggests functions also outside of the hematopoietic system*. *Oncogene*, 2000. **19**(9): p. 1215-24.

Literaturverzeichnis

58. Amson, R., et al., *The human protooncogene product p33pim is expressed during fetal hematopoiesis and in diverse leukemias*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(22): p. 8857-61.
59. Borillo, G.A., et al., *Pim-1 kinase protects mitochondrial integrity in cardiomyocytes*. Circ Res, 2010. **106**(7): p. 1265-74.
60. Cottage, C.T., et al., *Cardiac progenitor cell cycling stimulated by pim-1 kinase*. Circ Res, 2010. **106**(5): p. 891-901.
61. Laskey, W.K., *Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study*. Catheter Cardiovasc Interv, 2005. **65**(3): p. 361-7.
62. Ma, X.J., et al., *Effect of postconditioning on coronary blood flow velocity and endothelial function in patients with acute myocardial infarction*. Scand Cardiovasc J, 2006. **40**(6): p. 327-33.
63. Darling, C.E., et al., *'Postconditioning' the human heart: multiple balloon inflations during primary angioplasty may confer cardioprotection*. Basic Res Cardiol, 2007. **102**(3): p. 274-8.
64. Yang, X.C., et al., *Reduction in myocardial infarct size by postconditioning in patients after percutaneous coronary intervention*. J Invasive Cardiol, 2007. **19**(10): p. 424-30.
65. Thibault, H., et al., *Long-term benefit of postconditioning*. Circulation, 2008. **117**(8): p. 1037-44.
66. Wang, G., et al., *Effects of the number and interval of balloon inflations during primary PCI on the extent of myocardial injury in patients with STEMI: does postconditioning exist in real-world practice?* J Invasive Cardiol, 2009. **21**(9): p. 451-5.
67. Lonborg, J., et al., *ST-Segment resolution and clinical outcome with ischemic postconditioning and comparison to magnetic resonance*. Am Heart J, 2010. **160**(6): p. 1085-91.
68. Garcia, S., et al., *Long-term follow-up of patients undergoing postconditioning during ST-elevation myocardial infarction*. J Cardiovasc Transl Res, 2011. **4**(1): p. 92-8.
69. Lavi, S., et al., *Sevoflurane in acute myocardial infarction: a pilot randomized study*. Am Heart J, 2014. **168**(5): p. 776-83.
70. Bayne, K., *Revised Guide for the Care and Use of Laboratory Animals available*. American Physiological Society. Physiologist, 1996. **39**(4): p. 199, 208-11.
71. Cheney, I.W., et al., *Identification and structure-activity relationships of substituted pyridones as inhibitors of Pim-1 kinase*. Bioorg Med Chem Lett, 2007. **17**(6): p. 1679-83.
72. Sonner, J.M., D. Gong, and E.I. Eger, 2nd, *Naturally occurring variability in anesthetic potency among inbred mouse strains*. Anesth Analg, 2000. **91**(3): p. 720-6.
73. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
74. Redel, A., et al., *Activation of mitochondrial large-conductance calcium-activated K⁺ channels via protein kinase A mediates desflurane-induced preconditioning*. Anesth Analg, 2008. **106**(2): p. 384-91, table of contents.
75. Redel, A., et al., *Impact of ischemia and reperfusion times on myocardial infarct size in mice in vivo*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233**(1): p. 84-93.
76. Wang, C., et al., *The influence of B-cell lymphoma 2 protein, an antiapoptotic regulator of mitochondrial permeability transition, on isoflurane-induced and ischemic postconditioning in rabbits*. Anesth Analg, 2006. **102**(5): p. 1355-60.
77. Amaravadi, R. and C.B. Thompson, *The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets*. J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2618-24.
78. Liu, D., et al., *Pim-3 protects against cardiomyocyte apoptosis in anoxia/reoxygenation injury via p38-mediated signal pathway*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(11): p. 2315-22.

Literaturverzeichnis

79. Penna, C., et al., *Postconditioning induces an anti-apoptotic effect and preserves mitochondrial integrity in isolated rat hearts*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1787**(7): p. 794-801.
80. Shimizu, S., M. Narita, and Y. Tsujimoto, *Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC*. *Nature*, 1999. **399**(6735): p. 483-7.
81. Imahashi, K., et al., *Transgenic expression of Bcl-2 modulates energy metabolism, prevents cytosolic acidification during ischemia, and reduces ischemia/reperfusion injury*. *Circ Res*, 2004. **95**(7): p. 734-41.
82. Zhu, L., et al., *Regulation of sodium-calcium exchange and mitochondrial energetics by Bcl-2 in the heart of transgenic mice*. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. **33**(12): p. 2135-44.
83. Bernardi, P. and V. Petronilli, *The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal*. *J Bioenerg Biomembr*, 1996. **28**(2): p. 131-8.
84. Ge, Z.D., et al., *Isoflurane postconditioning protects against reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition by an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism*. *Anesthesiology*, 2010. **112**(1): p. 73-85.
85. Jamnicki-Abegg, M., et al., *Isoflurane inhibits cardiac myocyte apoptosis during oxidative and inflammatory stress by activating Akt and enhancing Bcl-2 expression*. *Anesthesiology*, 2005. **103**(5): p. 1006-14.
86. Maulik, N., et al., *Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti-death gene Bcl-2*. *Circulation*, 1999. **100**(19 Suppl): p. II369-75.
87. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. *Cell*, 1997. **91**(2): p. 231-41.
88. Drenger, B., et al., *Diabetes blockade of sevoflurane postconditioning is not restored by insulin in the rat heart: phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3- and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated inhibition*. *Anesthesiology*, 2011. **114**(6): p. 1364-72.
89. Penna, C., et al., *Postconditioning cardioprotection against infarct size and post-ischemic systolic dysfunction is influenced by gender*. *Basic Res Cardiol*, 2009. **104**(4): p. 390-402.

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Markus Lange für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit diese wissenschaftliche Arbeit zu erstellen.

Mein herzlicher Dank ergeht auch an Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Norbert Roewer für die Möglichkeit meine Dissertation in seiner Klinik anzufertigen.

Ein ausdrücklich herzlicher Dank gebührt meinem Betreuer Herrn Dr. Jan Stumpner für die sehr gute Zusammenarbeit, die konstruktiven Gespräche, die Anleitung wissenschaftliche Fragenstellungen zu bearbeiten und deren Ergebnisse kritisch zu hinterfragen sowie die ständige Unterstützung bei der Erstellung dieser Doktorarbeit.

Besonderer Dank gilt auch Frau Joanna Pocij für die Einarbeitung in die molekularbiologischen Methoden und Frau Katharina Pech, die mir immer mit Rat zur Seite stand. Auch bei allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Markus Lange möchte ich mich für die stets aufmunternden Gespräche sowie die sehr gute Arbeitsatmosphäre bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mir mein Studium ermöglicht und mich stets unterstützt und begleitet haben.